RADIKALBILDUNG VON BROMIERTEN METHANDERIVATEN IN VIVO

Werner Kähn

Diss München 1984

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. A. Schmid

RADIKALBILDUNG VON BROMIERTEN METHANDERIVATEN IN VIVO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Werner Kähn
aus
Baldingen

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. M. Merkenschlager

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meiner Frau

und

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Radikalbildung in vivo	3
1.1	Definition und Eigenschaften	3
1.2	Nachweis von Radikalen	3
1.2.1	Elektronen-Spin-Resonanz	3
1.2.2	Thiobarbitursäure-Methode	3
1.2.3	UV-Spektrometrie	4
1.2.4	Fluoreszenz-Spektroskopie	4
1.2.5	In-vivo Messung der Lipidperoxidation durch Nachweis flüchtiger Kohlenwasserstoffe	4
1.3	Bildung von Radikalen in vivo	5
1.3.1	Unimolekulare Homolyse	5
1.3.2	Ein-Elektronentransfer von Metallionen	6
1.3.3	Radiolyse	8
1.3.4	Photolyse	9
1.3.5	Umweltschadstoffe	9
1.3.5.1	Ozon	9
1.3.5.2	Singletsauerstoff	10
1.3.5.3	Stickstoffoxide	10
1.3.5.4	Halogen-Kohlenwasserstoffe	10
1.3.6	Metabolische Radikalbildung	11
1.4	Toxikologische Bedeutung von Radikalen	14
1.4.1	Wirkung auf Lipide	14
1.4.2	Wirkung auf Enzyme und Proteine	17
1.4.3	Wirkung auf andere biologische Bausteine	17
1.4.4	Bedeutung für biologische Membranen	18
1.5	Schutzmechanismen des Organismus	19
1.5.1	Niedriger Sauerstoffpartialdruck	19
1.5.2	Antioxidantien	19

		Seite
1.5.3	Enzyme	20
1.5.3.1	Peroxidasen und Katalasen	20
1.5.3.2	Superoxid-Dismutasen	21
1.5.3.3	Andere Enzyme	21
1.5.4	Thiole	21
2	Bromierte Methanderivate	23
2.1	Monobrommethan	23
2.1.1	Verwendung und praktische Bedeutung	23
2.1.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	24
2.1.3	Stoffwechselverhalten	25
2.1.3.1	Resorption	25
2.1.3.2	Verteilung im Organismus	25
2.1.3.3	Metabolisierung	26
2.1.3.4	Ausscheidung	27
2.1.4	Toxikologische Eigenschaften	27
2.2	Dibrommethan	29
2.2.1	Verwendung und praktische Bedeutung	29
2.2.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	29
2.2.3	Stoffwechselverhalten	30
2.2.3.1	Resorption	30
2.2.3.2	Verteilung und Metabolisierung	30
2.2.4	Toxikologische Eigenschaften	34
2.3	Tribrommethan	35
2.3.1	Verwendung und praktische Bedeutung	35
2.3.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	36
2.3.3	Stoffwechselverhalten	37
2.3.3.1	Resorption	37
2.3.3.2	Verteilung im Organismus	37
2.3.3.3	Metabolisierung	37
2.3.3.4	Ausscheidung	40
2.3.4	Toxikologische Eigenschaften	40

		Seite
2.4	Tetrabrommethan	43
2.4.1	Verwendung und praktische Bedeutung	43
2.4.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	43
2.4.3	Stoffwechselverhalten	43
2.4.3.1	Resorption	43
2.4.3.2	Verteilung und Metabolisierung	44
2.4.3.3	Ausscheidung	44
2.4.4	Toxikologische Eigenschaften	44
III	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	46
1	Experimentelle Problemstellung	46
2	Versuchsplan	46
3	Untersuchungsmethodik	47
3.1	Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung	47
3.2	Gewinnung der Exspirationsluft	50
3.3	Versuchsdurchführung	50
3.4	Kohlenwasserstoffbestimmung	51
3.5	Malondialdehydbestimmung	51
3.6	Chemikalien	52
4	Versuchsauswertung	54
4.1	Qualitative Auswertung	54
4.2	Quantitative Auswertung	54
4.2.1	Eichkurven für Kohlenwasserstoffe	54
4.2.2	Berechnung der Kohlenwasserstoffexspiration	59
4.2.3	Eichkurve für Malondialdehyd	59
4.2.4	Berechnung der Malondialdehydbildung	61
5	Ergebnisse	62
5.1	Vorversuche	62
5.1.1	Blindversuche mit synthetischer Luft	62
5.1.2	Blindversuche mit Referenzgasen	63
5.1.3	Kontrollversuche mit unbehandelten Versuchstieren	64

		Seite
5.2	Testversuche	65
5.2.1	Versuche mit Monobrommethan (Methylbromid)	65
5.2.1.1	Blindversuche mit Monobrommethan	65
5.2.1.2	Testversuche mit Monobrommethan	66
5.2.1.3	Abhängigkeit der Monobrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck	72
5.2.2	Versuche mit Dibrommmethan (Methylenbromid)	75
5.2.2.1	Blindversuche mit Dibrommethan	75
5.2.2.2	Kontrollversuche mit Paraffinöl	78
5.2.2.3	Testversuche mit Dibrommethan	79
5.2.2.4	Abhängigkeit der Dibrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck	83
5.2.3	Versuche mit Tribrommethan (Bromoform)	86
5.2.3.1	Blindversuche mit Tribrommethan	86
5.2.3.2	Testversuche mit Tribrommethan	87
5.2.3.3	Abhängigkeit der Tribrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck	93
5.2.4	Versuche mit Tetrabrommethan (Tetrabrom-kohlenstoff)	96
5.2.4.1	Blindversuche mit Tetrabrommethan	96
5.2.4.2	Testversuche mit Tetrabrommethan	97
5.2.4.3	Abhängigkeit der Tetrabrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck	101
5.3	Auswertung der Versuchsergebnisse	104
IV	DISKUSSION	109
1	Methodik	109
2	Ergebnisse	110
V	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	115
VI	LITERATURVERZEICHNIS	117

I EINLEITUNG

Halogenierte Kohlenwasserstoffe sind weltweit verbreitete Verbindungen, die heute in nahezu allen Lebensbereichen des Menschen angetroffen werden. Hierzu zählen Methanderivate (z. B. Methylbromid, Tetrachlorkohlenstoff, Jodoform), Ethanderivate (z. B. Halothan, Enfluran, Methoxyfluran) Ethenderivate (z. B. Vinylchlorid, Perchlorethylen), Aromaten (z. B. polybromierte bzw. polychlorierte Biphenyle, Chlornaphthaline) und viele andere Verbindungen.

Diese Stoffe sind alle von großer technischer und medizinischer Bedeutung.

Wenn auch die bromierten Methanderivate nach ihrem Verbreitungs- und Anwendungsbereich hinter ihren chlorierten Verwandeten zurücktreten, so stellen sie doch mit Methylbromid einen Vertreter, welcher in der Land-, Forst- und Vorratswirtschaft weltweit stark eingesetzt wird und gleichzeitig als gefährliches, weil geruch- und geschmackloses Gift bekannt ist (Biol. Bundesanstalt, 1961; Borbely, 1961; Volger, 1962; von Oettingen, 1964; Infestation Control, 1969; Wohlgemuth, 1971; Römpp, 1974).

Von anderen Vetretern dieser Reihe,z. B. Tetrabrommethan und Bromoform, ist eine erhebliche Hepatotoxizität bekannt (Lucas, 1928; von Oettingen, 1955; Kutob und Plaa, 1962; Reynolds, 1972), die bei Dibrommethan nicht nachgewiesen werden konnte (Kutob und Plaa, 1962; Reynolds, 1972).

Bromoform ist zwar heute aus der medizinischen Therapie gegen Keuchhusten und als Beruhigungsmittel gänzlich verschwunden, wurde jedoch neuerdings in gechlortem Trinkwasser nachgewiesen (Bätjer et al., 1979).

Weiterhin sind viele bromierte mischhalogenierte Kohlenwasserstoffe bekannt (Halothan, $CBrCl_3$, $CBrF_3$, $CBrClF_2$, CH_2BrCl), die z. T. als Feuerlöschmittel Bedeutung haben.

Von halogenierten Kohlenwasserstoffderivaten konnte inzwischen durch zahlreiche Arbeiten belegt werden, daß sie in vivo durch Metabolisierung in freie Radikale umgewandelt werden (Recknagel, 1967; Slater, 1972; Di Luzio, 1973; Riely et al., 1974; Schmid und Jungbauer, 1980; Schmid und Beuter, 1981; Gienger, 1982; Kreuzer, 1982; u.v.a.), welche wiederum als äußerst reaktionsfähige, stark oxidierende Intermediate bekannt sind (Demopoulos, 1973; Pryor, 1976). Dadurch werden zelluläre und subzelluläre Strukturen, wie lipidhaltige Membranen, Nucleinsäuren, Proteine und Enzyme im Organismus geschädigt bzw. inaktiviert (Slater, 1972; Demopoulos, 1973; Mc Cay, 1981).

Die Neigung zur Radikalbildung solcher Verbindungen in vivo ist theoretisch dem Grad der Halogensubstitution direkt und der Elektronegativität der Halogensubstituenten indirekt proportional (Reynolds, 1972; Musgrave, 1974; Reynolds und Moslen 1980), wird jedoch von zahlreichen Faktoren - z.B. dem Löslichkeitsverhalten einer Verbindung - modifiziert.

Wegen dieser Unsicherheiten ist in früheren Untersuchungen am Institut die Radikalbildung der c h l o r i e r t e n Methanderivate experimentell geprüft worden (Schmid und Jungbauer, 1980; Wurster, 1980). In Fortsetzung dieser Untersuchungen sind in der vorliegenden Arbeit Monobrommethan, Dibrommethan, Tribrommethan (Bromoform) und Tetrabrommethan auf radikalbildende Eigenschaften i n v i v o untersucht worden.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Radikalbildung in vivo

1.1 Definition und Eigenschaften von Radikalen

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem freien, unpaarigen Elektron auf einer äußeren Schale (Demopoulos,1973; Schmid 1982).

Es kann sich dabei sowohl um ein Anion ($R^{\cdot -}$) als auch um ein Kation ($R^{\cdot +}$) oder um ungeladene Teilchen ($R^{\cdot}$) handeln (Demopoulos, 1973; Pryor, 1976).

Weil sie keine stabile Elektronenverteilung besitzen, sind freie Radikale im allgemeinen sehr reaktionsfähig (Demopoulos, 1973), obwohl es auch beträchtliche Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der einzelnen Radikale gibt und die Reaktionsfähigkeit auch von der Konzentration und der Temperatur abhängt (Pryor, 1976).

Außerdem sind Radikale äußerst kurzlebig und kommen im allgemeinen nur in geringer Konzentration von etwa 10^{-9} bis 10^{-4} mol/l vor (Pryor, 1976; Zimmermann, 1982). Radikale sind auf Grund ihrer Elektronenkonfiguration elektrophil und neigen besonders zu Oxidations- und Additionsreaktionen (Pryor, 1976; Schmid, 1982).

1.2 Nachweis von Radikalen

1.2.1 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)

Nur unter Ausnutzung ihres Paramagnetismus können Radikale direkt nachgewiesen werden. Mit der ESR-Methode gelingt es, die magnetische Resonanz des unpaarigen Elektrons zu erfassen (Haugaard, 1968; Saprin und Piette, 1977).

Alle anderen Nachweismethoden sind indirekte Methoden und weisen Folgeprodukte aus Radikalreaktionen, meist Lipidperoxide, nach.

1.2.2 Thiobarbitursäure (TBA)-Methode

Die TBA-Methode ist weit verbreitet und einfach durchzuführen. Es wird Malondialdehyd, ein Zerfallsprodukt von Lipidperoxiden, nachgewiesen, der mit Thiobarbitursäure ein rotes

Pigment bildet und photometrisch (Maximum bei 532 nm) gemessen werden kann (Bernheim et al., 1945; Abramson, 1949; Dahle et al., 1962; Dillard und Tappel, 1971 und 1973; Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976; Asakawa und Matsushita, 1979; Terao und Matsushita, 1981).

Dabei handelt es sich um eine semiquantitative Nachweismethode, die nur im positiven Fall beweisend ist (Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976).

1.2.3 UV-Spektrometrie

Konjugierte Diene entstehen bei der Lipidperoxidation (Cohen, 1979). Die konjugierten Diene lassen sich in Gewebeextrakten durch Absorption von UV-Strahlen (Absorptionsmaximum bei 233 nm) quantitativ bestimmen (Dahle et al., 1962; Recknagel und Goshal, 1966; Haase und Dunkley, 1969; Sell und Reynolds, 1969; Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976).

1.2.4 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektroskopie ist eine vergleichsweise neue Methode, bei der durch Reaktion von Carbonylgruppen oxidierter Lipide mit primären Aminen (z.B. Phosphatidylethanolamin) fluoreszierende Pigmente mit der Struktur von konjugierten Schiff'schen Basen (R-N=CH-CH=CH-R') gebildet werden, welche schließlich fluoreszenzspektroskopisch erfaßt werden können (Dillard und Tappel, 1971; Fletcher et al., 1973; Malshed et al., 1974; Trombly et al., 1975; Plaa und Witschi, 1976; Dumelin et al., 1977; Frank et al., 1980).

1.2.5 Peroxid-Bestimmung

Lipidperoxide oxidieren in saurem Medium Jodid zu elementarem Jod, welches entweder mit Natriumthiosulfat titriert oder kolorimetrisch bestimmt werden kann (Bunyan et al., 1967; Asakawa und Matsushita, 1980). Eine andere Methode der Peroxidbestimmung ist die Messung der katalytischen Reaktionsbeschleunigung der Farbstoffbildung aus N,N'-Diphenyl-p--phenylendiamin (DPPD) und Methanol (Dugan, 1960).

1.2.6 Warburg-Methode

Bei der Warburg-Methode wird die Sauerstoffabsorption während der Lipidperoxidbildung in vitro in einer Warburg--Apparatur manometrisch gemessen (Dillard und Tappel, 1973).

1.2.7 In-vivo Messung der Lipidperoxidation durch gaschromatographischen Nachweis flüchtiger kurzkettiger Kohlenwasserstoffe

Der peroxidative Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren ergibt außer anderen, Sauerstoff enthaltenden Abbauprodukten, auch flüchtige Kohlenwasserstoffe. Diese kann man in der Exspirationsluft von Mensch und Tier gaschromatographisch nachweisen (Riely et al., 1974).

Erstmals konnten Lieberman und Hochstein, (1966) in vitro bei der Lipidperoxidation Ethen nachweisen. Später gelang auch der Nachweis von Ethan als Produkt der Lipidperoxidation in vivo (Riely et al., 1974).

Es wurde vielfach gezeigt, daß der gaschromatographische Nachweis von kurzkettigen Kohlenwasserstoffgasen eine zuverlässige Methode ist, die Lipidperoxidation in vivo zu messen: Dabei treten E t h e n (Lieberman und Hochstein, 1966; Cohen et al., 1968) E t h a n (Cohen et al., 1968; Riely et al., 1974; Dillard et al., 1976; Dumelin et al., 1977; Dumelin und Tappel, 1977; Köster et al., 1977; Frank et al., 1980; Tappel und Dillard, 1981) P e n t a n (Dillard et al., 1976; Dumelin et al., 1977; Dumelin und Tappel, 1977; Frank et al., 1980; Tappel und Dillard, 1981) und einige andere flüchtige Kohlenwasserstoffe (Frank et al., 1980) in vivo auf. Die Art des freigesetzten Kohlenwasserstoffes ist abhängig von der geschädigten und abgebauten Fettsäure. So stammt Pentan von Fettsäuren aus der Familie der ω-6-ungesättigten Fettsäuren

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH = CH - R$$

während Ethan bei oxidativer Schädigung von ω-3-ungesättigten

$$CH_3 - CH_2 - CH = CH - R$$

Fettsäuren nachgewiesen werden kann (Tappel und Dillard, 1981).

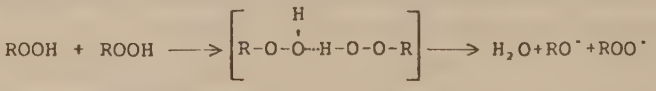
1.3 Bildung von Radikalen in vivo

1.3.1 Unimolekulare Homolyse

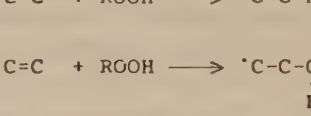
Freie Radikale entstehen, wenn eine schwache kovalente Bindung so gelöst wird, daß das gemeinsame Elektronenpaar auf beide entstehende Bruchstücke verteilt wird. Bei sogenannten Initiatormolekülen von Radikalreaktionen wird die Bindung schon bei Körpertemperatur gespalten (Pryor, 1976).

Besonders Lipidperoxide, die enzymatisch bei biochemischen Synthesen oder durch Autoxidation von vielfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) entstanden sind, neigen über Wechselwirkungen mit anderen Molekülen (Alkohol, organische Säuren, andere Peroxide) zur "molecule-assisted-homolysis" (MAH) (Pryor, 1976).

Bei dieser Reaktion wird die zur Spaltung benötigte Dissoziationsenergie durch Bildung einer neuen Bindung zum Teil bereitgestellt (Zimmermann, 1982).



oder C=C + ROOH ⟶ ˙C-C-H + ROO˙



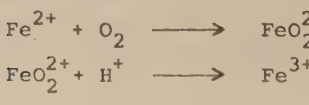
(Pryor, 1976)

1.3.2 Ein-Elektronentransfer von Metallionen

Der Ein-Elektronentransfer ist eine Redox-Reaktion zwischen Ionen von Übergangsmetallen, wie Eisen, Kupfer etc. und anderen Molekülen, die schließlich zur Radikalbildung führt, und eine sehr wichtige Rolle bei der Radikalbildung in vivo spielt (Pryor, 1976; Schmid und Christoph, 1980).

Einige Beispiele mit Ferroionen:

a) Induktion von Hydroperoxidradikalen (nach Smith und Dunkley, 1962):



Folgereaktion mit Lipiden:

$$HO_2^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + H_2O_2$$

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$$

$$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

Anschließende Kettenreaktionen sind möglich (Lindquist, 1968; Schmid und Christoph, 1980).

b) Induktion von Superoxidradikalen ($O_2^{\cdot -}$) (nach Mead, 1976):

$$Fe^{2+} + O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+} + O_2^{\cdot -}$$

Folgereaktion mit H_2O_2 nach Haber und Weiß (1934)

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + O_2$$

oder mit Lipidhydroperoxiden nach Peters und Foote (1976)

$$O_2^{\cdot -} + LOOH \longrightarrow LO^{\cdot} + OH^{-} + O_2$$

c) Spaltung von Wasserstoffperoxid (Fenton-Reaktion) (nach Pryor, 1976; Willson, 1979)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

d) Spaltung von Lipidhydroperoxiden:

$$Fe^{2+} + LOOH \longrightarrow Fe^{3+} + LO^{\cdot} + OH^{-}$$ (Mead, 1976)

$$Fe^{3+} + LOOH \longrightarrow Fe^{2+} + LOO^{\cdot} + H^{+}$$ (Lindquist, 1968)

Die entstehenden Radikale (besonders aggressiv sind Hydroxylradikale) reagieren infolge ihrer hohen Reaktionsfähigkeit in vivo sehr schnell wieder mit Proteinen, Aminosäuren oder Lipiden und verursachen durch ihre starke Oxidationswirkung schwere Schädigungen von zellulären und subzellulären Membranen, Proteinen, Nucleinsäuren, etc. (Demopoulos, 1973; Mead, 1976; Willson, 1979; Schmid und Christoph, 1980).

1.3.3 Radiolyse

Unter Radiolyse versteht man die Spaltung von Molekülen durch ionisierende Strahlung. Am häufigsten ist davon das Wassermolekül betroffen, das entweder zum Kation-Radikal und einem freien Elektron umgewandelt

$$H_2O \longrightarrow H_2O^{\cdot +} + e^-$$ (Pryor, 1976)

oder angeregt werden kann

$$H_2O \longrightarrow H_2O^*$$ (Lissner und Hug, 1975)

Diese sehr reaktionsfähigen Zwischenprodukte induzieren wiederum weitere Radikale durch Wechselwirkungen mit Molekülen des umgebenden Mediums.

$$H_2O^{\cdot +} \longrightarrow H^+ + OH^{\cdot}$$

$$e^- + H_2O \longrightarrow H_2O^{\cdot -}$$

$$H_2O^{\cdot -} \longrightarrow H^{\cdot} + OH^-$$

$$H_2O^* \longrightarrow H^{\cdot} + OH^{\cdot}$$

$$H_2O^* + H_2O \longrightarrow H_2O^{\cdot +} + H_2O^{\cdot -}$$

(nach Lissner und Hug, 1975; Pryor, 1976)

Solche Produkte der Radiolyse schädigen Lipide, Nucleinsäuren und Proteine (Feinstein, 1963; Philpot, 1963; Phillips, 1968; Wills, 1970; Wills und Wilkinson, 1970; Pryor, 1976; Zimmermann, 1982).

Insgesamt ist jedoch die Bedeutung der natürlichen ionisierenden Strahlung nur gering (Pryor, 1976), wenn sie auch u.a. für die durch radioaktive Strahlung ausgelöste Mutagenität verantwortlich ist (Zimmermann, 1982).

1.3.4 Photolyse

Freie Radikale entstehen auch durch Absorption von Lichtenergie, insbesondere UV-Licht (Pryor, 1976).

Eine Bedeutung hat diese Form der Radikalbildung hauptsächlich für transparente Mikroorganismen. Mensch und Tiere sind nur bei extrem schwacher Pigmentierung und evtl. bestehenden anderen Abnormalitäten betroffen. Ansonsten beschränkt sich die Wirkung der UV-induzierten Radikale auf die Haut (Pryor, 1976), wo sie auch für die Photokarzinogenese verantwortlich gemacht wird (Zimmermann, 1982). Außerdem werden auch Alterungsvorgänge in der Haut u.a. einer photoinduzierten Autoxidation von Kollagen zugeschrieben (Zimmermann, 1982).

1.3.5 Umweltschadstoffe

1.3.5.1 Ozon

Ozon kommt in normaler Luft in Konzentrationen von 0,01 - 0,02 ppm vor und kann bereits in dieser Konzentration zur Autoxidation von PUFA beitragen (Pryor, 1973, 1976).

Verschmutzte ozonreiche Luft verursacht mehr biologischen Schaden als ionisierende Umgebungsstrahlung (Pryor, 1976).

So reagiert Ozon mit Alkanen über einen Radikalmechanismus zu Alkoholen:

$$RH + O_3 \longrightarrow R^{\cdot} + HO_3^{\cdot} \longrightarrow R^{\cdot} + O_2 + OH^{\cdot} \longrightarrow ROH + O_2$$

Ebenso entstehen bei der Umsetzung von Aldehyden, Alkanen, Aminen (Bailey und Keller, 1968), Alkoholen, Enolen und vielen anderen organischen Verbindungen mit Ozon Radikale entweder als Zwischenstufen oder als Endprodukte (Pryor, 1976).

1.3.5.2 Singletsauerstoff

Molekularer Sauerstoff hat die besondere Eigenschaft eines paramagnetischen Diradikals (Molekül bei dem das jeweils "einsame" Elektron auf antibindenden Orbitalen beider Atome lokalisiert ist) (Pryor, 1976).

Absorbiert ein O_2-Molekül in geeigneter Weise Energie (Licht- oder thermische Energie), so gelangen seine Valenzelektronen in einen angeregten Zustand mit Spinumkehr (Singletzustand), in dem es die Neigung besitzt, mit einer Vielzahl von organischen Verbindungen in Initiations- und Additionsreaktionen Radikale zu bilden (Tappel, 1965; Demopoulos, 1973; Pryor, 1976; Foote, 1976).

1.3.5.3 Stickstoffoxide

Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO_2) sind selbst schon Radikale, die einerseits so stabil sind, daß sie als Luftschadstoffe in höherer Konzentration (0,1 - 0,2 ppm) vorkommen als z.B. Ozon, andererseits jedoch noch so reaktionsfähig sind, daß sie Radikalreaktionen auslösen können (Pryor, 1976).

So können durch Wechselwirkungen von NO_2 mit Olefinen Additionsreaktionen an bzw. cis-trans Isomerisierungen und Autoxidationen von Fettsäuren in biologischen Membranen vorkommen (Thomas, 1968; Felmeister et al., 1970; Estefan et al., 1970; Jonkman et al., 1970; Roehm et al., 1971).

1.3.5.4 Halogen-Kohlenwasserstoffe

Halogen-Kohlenwasserstoffe stellen eine medizinisch äußerst wichtige Stoffgruppe dar, mit Vertretern, von denen die Biotransformation zu Radikalen in vivo nachgewiesen wurde (Schmid, 1982). Sie werden im Organismus vorwiegend in

der Leber und dort von den mischfunktionellen Monooxygenasen (MFO) metabolisiert, wobei freie Radikale entstehen können (Recknagel, 1967; Slater, 1972; DiLuzio, 1973; Schmid und Jungbauer, 1980; Schmid, 1982). So wird zum Beispiel CCl_4 von den MFO durch reduktive Dehalogenierung zum Trichlormethanradikal und Chlorid gespalten (Slater, 1972; Riely et al., 1974; Mead, 1976; Recknagel et al., 1977; Sagai und Tappel, 1979).

$$CCl_4 + e^- \longrightarrow CCl_3^{\cdot} + Cl^-$$

Die Neigung zur Radikalbildung ist bei den verschiedenen Halogen-Kohlenwasserstoffen unterschiedlich stark ausgeprägt und hängt sowohl von der Elektronegativität der Halogenatome und anderer Substituenten als auch vom Grad der Halogensubstitution ab (Reynolds, 1972; Reynolds und Moslen, 1980). So ist Brom-Trichlormethan einer der stärksten Radikalbildner in der Reihe der halogenierten Kohlenwasserstoffe (Reynolds und Moslen, 1980), während bei Mono- und Dichlormethan keine Radikalbildung in vivo nachgewiesen werden konnte (Schmid und Jungbauer, 1980).

1.3.6 Metabolische Radikalbildung

Bei enzymatischen Umbauprozessen entstehen oft als Zwischenstufen Radikale, die von der Enzymoberfläche entweichen können, bevor sie weiter oxidiert bzw. reduziert werden (Pryor, 1976).

Dies ist insbesondere dann denkbar, wenn Zwei-Elektronen--Übergänge in zwei Teilschritten erfolgen, bei denen jeweils nur ein Ein-Elektronen-Transfer stattfindet, wie man es zum Beispiel aus der Atmungskette kennt (Pryor, 1976).

Den größten Anteil an der metabolischen Radikalbildung in vivo haben die oben genannten mischfunktionellen Monooxygenasen (MFO) der Leber (Schmid, 1982), Enzymketten, die als terminales Enzym Cytochrom P-450 enthalten (Schenkman und Gibson, 1981). Sie sind im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und besonders konzentriert in solchen Hepatozyten, die zirkulär um die Zentralvene der Leberläppchen angeordnet sind (sauerstoffarme Zone III) (Sweeny, 1981). Vorwiegend hydrophobe Fremdstoffe aber auch körpereigene Stoffe können von diesen Enzymsystemen sowohl oxidiert als auch reduziert werden (Schenkman und Gibson, 1981). Ihre Aktivität kann durch Enzyminduktoren gesteigert (Sweeny, 1981) oder durch -inhibitoren gehemmt (Yamamoto, 1973) werden.

Auch zahlreiche Arzneimittel (z.B. Barbiturate) Umweltgifte (z.B. DDT, PCB, PBB ...) oder längerer starker Alkoholgenuß erhöhen die Aktivität der MFO beträchtlich (Schmid, 1982).

Superoxidradikale und Peroxide können bei einer Fremdstoffoxidation auf folgende Weise entstehen:

$$X + E_o \longrightarrow (XE_o)$$

$$(XE_o) + e^- \longrightarrow (XE_r)$$

$$(XE_r) + O_2 \longrightarrow (XE_oO_2^{\cdot -}) \rightleftharpoons (XE_rO_2)$$

$$(XE_oO_2^{\cdot -}) \longrightarrow (XE_o) + O_2^{\cdot -}$$

$$(XE_oO_2^{\cdot -}) + e^- \longrightarrow (XE_rO_2^{\cdot -}) \rightleftharpoons (XE_oO_2^{--})$$

$$(XE_oO_2^{--}) \longrightarrow (XE_o) + O_2^{--}$$

$$(XE_rO_2^{\cdot -}) + 2H^+ \longrightarrow XO + E_o + H_2O$$

(nach Schmid, 1982)

Wobei bedeuten:

X = Fremdstoff (Xenobioticum)

E_o = oxidiertes Enzym (Cytochrom P-450)

E_r = reduziertes Enzym

e^- = Elektron

Diese können wiederum nach der von Haber und Weiss entdeckten Reaktion (siehe unter 1.3.2) zu den sehr reaktionsfähigen Hydroxylradikalen zerfallen. Hydroxylradikale können auch noch durch andere enzymatische Prozesse entstehen, zum Beispiel (Flavinenzym = Fl):

$$Fl + O_2 \longrightarrow Fl^{\cdot}_{(oxid.)} + O_2^{\cdot -}$$

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\cdot} + O_2 + OH^-$$

(Mc Cay et al., 1972)

Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei geschädigten Mitochondrienmembranen, werden solche Hydroxylradikale nicht abgefangen, sondern entweichen von dem Enzymsystem und verursachen Schädigungen an umgebenden Strukturen (Mead, 1976).

Eine wichtige Rolle bei der metabolischen Radikalbildung in vivo spielt insbesondere auch die reduktive Spaltung von Xenobiotica (XY).

$$XY + E_o \longrightarrow XYE_o$$

$$XYE_o + e^- \longrightarrow (XYE_r)$$

$$(XYE_r) \longrightarrow X^{\cdot} + Y^- + E_o$$ (Mc Cay et al., 1980)

So werden zum Beispiel Halogen-Kohlenwasserstoffe von den MFO reduktiv dehalogeniert (Schmid, 1982; siehe auch 1.3.5.4).

Insgesamt können in vivo bei vielen enzymatischen Prozessen Radikale freigesetzt werden, so z.B. durch:

Enzyme der Atmungskette
Hydroxylasen
Oxidasen
Dioxygenasen
Guanyl-Cyclase
Prostaglandin-Synthetase
u.a.

(nach Fridovich, 1975; Zimmermann, 1982)

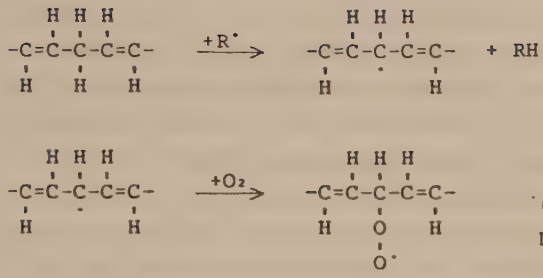
1.4 Toxikologische Bedeutung von Radikalen

Die erhebliche molekularpathologische Bedeutung der freien Radikale (Demopoulos, 1973) beruht darauf, daß sie Membranen von Zellen und Zellorganellen (endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien etc.), Proteine und Nucleinsäuren usw. infolge ihrer hohen Reaktionsfähigkeit und starken Oxidationswirkung schädigen (Demopoulos, 1973 ; Schmid und Christoph, 1980). Dabei treten Membranbrüche und -zertrümmerungen ebenso auf, wie spezifische Veränderungen an den Membranlipiden (Slater, 1972; Demopoulos, 1973; Mc Cay, 1981).

Die enge räumliche Beziehung von Lipiden und Proteinen in biologischen Membranen läßt deutliche Veränderungen auch an Proteinen und anderen membranbezogenen Strukturen erwarten, wie z.B. angelagerten Ribosomen, Oberflächenglykoproteinen, verschiedene komplexe Rezeptorstellen usw. (Demopoulos, 1973).

1.4.1 Wirkung auf Lipide

Besonders empfindlich gegenüber Radikalen sind Membranlipide mit einer Divinylmethan-artigen Teilstruktur (-CH=CH-CH_2-CH=CH-), da durch Mesomerie (Sykes, 1976) die C-H-Bindung der Methylengruppe (-CH_2-) durch die benachbarten Doppelbindungen bereits geschwächt ist und damit ein Radikalangriff begünstigt wird (Demopoulos, 1973 ; Mead, 1976), wie das folgende Reaktionsschema einer Lipidperoxidation von ungesättigten Fettsäuren zeigt:



(Tappel und Dillard, 1981)

Demopoulos (1973) bezeichnet die C-H-Bindung der Methylengruppe als teilaktiviert, die schon durch geringe Mengen von Initiatormolekülen oder Prooxidantien gelöst werden kann und Radikale entstehen läßt.

Grundsätzlich können Radikale auf folgende Weise mit Lipiden (LH) reagieren:

Initiationsreaktion:

$$R^{\cdot} + LH \longrightarrow L^{\cdot} + RH \quad (1)$$ (Mead, 1976)

Propagation:

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot} \quad (2)$$

$$LOO^{\cdot} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\cdot} \quad (3)$$ (nach Pryor, 1973)

Termination:

$$2\ L^{\cdot} \longrightarrow L\text{-}L \quad (4)$$

$$L^{\cdot} + LOO^{\cdot} \longrightarrow LOOL \quad (5)$$

$$2\ LOO^{\cdot} \longrightarrow LOOL + O_2 \quad (6)$$ (nach Pryor, 1973)

Eine weitere Termination kann durch Wechselwirkung von Radikalen mit Antioxidantien (z.B. Vitamin E) eintreten:

$$LOO^{\cdot} + \text{Vit.E}_{(red.)} \longrightarrow LOOH + \text{Vit. E}_{(ox.)}$$

(Tappel und Dillard, 1981)

Welche der o.g. Reaktionen bevorzugt abläuft, hängt auch von der Sauerstoffspannung im Gewebe ab (Pryor, 1973):

Bei hoher O_2-Konzentration ist Reaktion (2) bevorzugt. Damit entstehen mehr Lipidperoxid-Radikale (LOO˙) als Lipidradikale (L˙) und es erlangt auch Reaktion (6) als Terminationsreaktion größere Bedeutung (Pryor, 1973).

Wird der O_2-Parialdruck erniedrigt, kann eine Reaktion mit Sauerstoff nur beschränkt stattfinden, so daß die Endreaktion nach Gleichung (4) bevorzugt ist (Pryor, 1973).

Im Zytosol der lebenden Zelle haben die Reaktionen (5) und z.T. auch (4) eine überragende Bedeutung als Terminationsreaktionen, da hier der O_2-Partialdruck im Plasma weniger als 100 mm Hg beträgt (Pryor, 1973).

Folgen aus der Lipidperoxidbildung sind nach Barber und Bernheim (1967) Lipidvernetzung wie in Gleichung (6), ebenso die Bildung von konjungierten Dienen (-CH=CH-CH=CH-) (Cohen, 1979) und Produkte aus dem Lipidperoxidabbau, wie Malondialdehyd (Pryor, 1976; Gee und Tappel, 1981; Tappel und Dillard, 1981).

Lipidperoxide können auch mit vorhandenen Übergangsmetallionen in Wechselwirkung treten, wobei die Metallionen die Spaltung der Lipidperoxide katalysieren und neue Radikale entstehen lassen (Pryor, 1973; siehe unter 1.3.2 d).

Die entstehenden Lipoxy-Radikale (LO˙) reagieren sehr unspezifisch mit anderen Substanzen, so daß die gleichzeitige Anwesenheit von Lipiden, Metallionen und Sauerstoff zur Kooxidation von relativ inerten zellulären Bestandteilen führen kann (Roubal, 1971; Pryor, 1973).

1.4.2 Wirkung auf Enzyme und Proteine

Proteine und Enzyme in wässriger Lösung werden von Radikalen so verändert, daß es zu Polymerisation, Aufspaltung der Polypeptidketten und/oder Konformationsänderung kommen kann (Tappel, 1973).

Aromatische Aminosäuren stellen einen empfindlichen Angriffspunkt für Radikale dar, da ein oder mehrere Ring-Wasserstoffatome durch Radikale abgelöst werden können. Dadurch wird allerdings mit größerer Wahrscheinlichkeit lediglich eine Elektronenverschiebung am Ring als die Bildung eines neuen Radikals ausgelöst (Demopoulos, 1973).

Auch sind Aminosäuren und Enzyme mit SH-Gruppen sehr anfällig gegen Radikalwirkungen. So zählen Methionin und Cystein, aber auch Lysin und Histidin zu den empfindlichsten Aminosäuren (Tappel, 1973).

Die ebenfalls mögliche Vernetzung von Enzymen und Proteinen oder die Aufspaltung der Polypeptidketten führt zu einer schweren Störung der Proteinstruktur in subzellulären Membranen und Organellen. Dadurch geht die biologische Aktivität verloren oder wird stark vermindert (Tappel, 1973; Demopoulos, 1973).

1.4.3 Wirkung auf andere biologische Bausteine

Die schädigende Wirkung von freien Radikalen beschränkt sich nicht auf Lipide und Proteine. Vielmehr werden auch Nucleinsäuren (DNA/RNA) und deren Repair-Enzyme verändert, was wiederum Mutagenese bzw. Karzinogenese bedingen kann (Fridovich, 1976; Zimmermann, 1982).

Polysaccharide, wie z.B. Kollagen oder Hyaluronsäure, können durch Radikaleinflüsse zersetzt werden. Dies ist von Bedeutung bei Alterungsvorgängen in der Haut und bei Veränderungen der Synovia bzw. bestimmten Arthrosen (Zimmermann, 1982).

1.4.4 Bedeutung für biologische Membranen

Biologische Membranen enthalten die meisten Lipide mit ungesättigten Fettsäuren aller Gewebe im tierischen Organismus (Mc Cay, 1981), wobei besonders viele PUFA in der unpolaren Mittelzone der Membranen auftreten (Demopoulos, 1973).

Gleichzeitig ist aber auch die Löslichkeit von O_2 im unpolaren Medium sieben-bis achtmal größer als im polaren, wie auch hier die Konzentration der Metallkomplexe höher ist (Demopoulos, 1973).

Durch diese unmittelbare räumliche Nachbarschaft von Lipiden, Sauerstoff und katalytischen Metallkomplexen (z.B. gebundenes Eisen und Hämoproteine) kommt es in den biologischen Membranen leicht zu einer lawinenartig ablaufenden Lipidperoxidation, die schließlich durch eine Termination, durch Vernetzung, Vitamin E oder andere Schutzmechanismen beendet wird (Tappel, 1973).

Dadurch entstehen veränderte Kohlenwasserstoffmoleküle und vernetzte Makrostrukturen, die eine wichtige Rolle in der Zytopathologie spielen (Pryor, 1973; Flohé und Zimmermann, 1974), indem sie eine

- Störung von Transportvorgängen,
- Veränderung physiologischer Rezeptoren,
- Minderung oder Verlust der enzymatischen Aktivitäten von membrangebundenen Enzymsystemen und einen
- Verlust der Calciumsequestrationsfähigkeit der betroffenen Zellen mit Zelltod etc.

verursachen (Tappel, 1973; Plaa und Witschi, 1976; Recknagel, 1983).

1.5 Schutzmechanismen des Organismus gegen Radikale, angeregten Sauerstoff und/oder Peroxide

Die Schutzmechanismen des Organismus gegen Radikale und ihre Auswirkungen sind sehr vielseitig und unter physiologischen Bedingungen in ausreichender Zahl und Menge vorhanden, um größere oxidative Schäden zu verhindern (Halliwell, 1978; Remmer, 1982a). Die wichtigsten derartigen Mechanismen sind im folgenden angegeben.

1.5.1 Niedriger Sauerstoffpartialdruck

Der im Gewebe bestehende niedrige Sauerstoffpartialdruck ist für sich schon ein wichtiger Schutzmechanismus gegen Peroxidationsreaktionen (Recknagel et al., 1977).

1.5.2 Antioxidantien

Das biologisch wichtigste Antioxidans ist Vitamin E. Es kommt aufgrund seiner guten Lipidlöslichkeit zum größten Teil dort vor, wo auch besonders aktive Enzymsysteme für Oxidations- und Reduktionsvorgänge lokalisiert sind, das heißt in Mikrosomen- und Mitochondrienmebranen (Mc Cay et al., 1972).

Seine Rolle bei der Eliminierung von Radikalen ist schon längere Zeit bekannt (Tappel, 1972; Urano und Matsuo, 1976; Cohen, 1979; Mc Cay et al., 1981).

Bei der Reaktion mit freien Radikalen wird Vitamin E zu einem Chinon oxidiert (Tappel, 1972; Tappel und Dillard, 1981).

Auch Singletsauerstoff kann von Vitamin E inaktiviert werden (Mc Cay et al., 1981), aber auch von ß-Carotin und von Histidin (Fridovich, 1979).

Auf die Bedeutung von Vitamin E als Stimulator der Lipidperoxidation ("cross-over-Effekt") hat Slater (1979) hingewiesen.

Zur Gruppe der Antioxidantien zählen neben Vitamin E auch noch Flavonoide, Carotinoide und Phenole, deren Wirkungsweise jedoch noch nicht völlig erforscht ist. So ist z.B. über die Wirkung der Flavonoide im Organismus noch relativ wenig bekannt. Andererseits konnten die Radikal-quenchenden Eigenschaften einzelner Vertreter (wie Cyanidanol) in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden (Kappus et al., 1977; Köster-Albrecht et al., 1979; Remmer, 1982b).

Auch Katechole, z.B. Katechin und Isoproterenol oder 2-OH-Östradiol, Ethinylöstradiol usw. haben eine Radikal-neutralisierende Wirkung, zum Teil jedoch nur in vitro (Remmer, 1982a).

1.5.3 Enzyme

1.5.3.1 Peroxidasen und Katalasen

Die größte Rolle bei der Inaktivierung von Lipidperoxiden spielt im Organismus die selenhaltige Glutathion-Peroxidase (Oh et al., 1974).

Dabei werden die Lipidhydroperoxide zu Hydroxyfettsäuren oder Alkoholen und Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert (Chance et al., 1979; Mc Cay et al., 1981; Tappel und Dillard, 1981). Die dafür benötigten Elektronen werden von Glutathion (GSH) geliefert, welches als Kosubstrat dient (Mc Cay et al., 1981):

$$LOOH + 2\ GSH \xrightarrow{\text{GSH-Peroxidase}} LOH + H_2O + GSSG$$

Während Peroxidasen wenig substratspezifisch sind (Fridovich, 1976; Flohé, 1979), setzen die Katalasen ausschließlich Wasserstoffperoxid um (Fridovich, 1976):

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalase}} 2\ H_2O + O_2$$

1.5.3.2 Superoxid-dismutasen (SOD)

SOD wirken ebenfalls substratspezifisch indem sie ausschließlich Superoxidradikale inaktivieren (Fridovich, 1976):

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Das Superoxidradikal wird von SOD zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. Besonders große Konzentrationen von SOD treten in Erythrozyten und Muskelzellen auf, da hier die O_2-bindenden Ferroproteine eines besonderen Schutzes gegen $O_2^{\cdot -}$- Radikale bedürfen (Remmer, 1982a).

Im tierischen Organismus kommen nur kupfer- und zinkhaltige Dismutasen vor, während bei Bakterien auch mangan- und eisenhaltige bekannt sind (Fridovich, 1976). Die kupferhaltigen sind identisch mit bekannten kupferhaltigen Proteinen: Hepato-, Cerebro- und Erythrocuprein.

1.5.3.3 Andere Enzyme

Zu den Enzymen, die einen Schutz gegen Radikalwirkungen darstellen, können auch die Repair-Enzyme der DNS-Synthese gezählt werden (Zimmermann, 1982).

1.5.4 Thiole

Zu Radikal-inaktivierenden Thiolen gehört in erster Linie Glutathion, das eine Schlüsselsubstanz für Entgiftungsvorgänge der lebenden Zelle darstellt und unter physiologischen Bedingungen in genügender Menge in jeder Zelle vorhanden ist (Sies und Wendel, 1978).

Reduziertes Glutathion dient der Glutathion-Peroxidase als elektronenlieferndes Kosubstrat (siehe 1.5.3.1), das oxidiert und von der Glutathion-Reduktase wieder in die reduzierte Form übergeführt wird (Remmer, 1982a).

Schäden an biologischen Strukturen können auftreten, wenn ein GSH-Mangel vorliegt. Dieser kann entstehen, wenn

- eine starke Radikalbildung stattfindet, so daß das vorhandene GSH nicht ausreicht (Kiese, 1974),
- GSH-Reduktasen durch einen genetischen Defekt in ihrer Aktivität geschwächt sind (Beutler, 1969),
- ein genetisch bedingter Mangel an Glucose-6-Posphat-dehydrogenase vorliegt und damit nicht das für die Reduktion von GS-SG zu GSH benötigte NADPH bereitgestellt werden kann (Remmer, 1982a).

Schließlich gehören zu den im tierischen Organismus vorkommenden Thiolen noch Cystein und Methionin, die ebenfalls einen gewissen Schutz gegen Radikalreaktionen gewährleisten (Halliwell, 1978; Zimmermann, 1982).

2 Bromierte Methanderivate

2.1 Monobrommethan (Methylbromid)

2.1.1 Verwendung und praktische Bedeutung

Methylbromid wird in der chemischen Industrie zu organischen Synthesen, besonders zu Methylierungsreaktionen (z.B. Grignard-Reaktion) eingesetzt (Römpp, 1974). Außerdem dient es als Lösungsmittel, als Kühlmittel und ist in bestimmten Feuerlöschern als Löschsubstanz enthalten (Römpp, 1974).

In der Land- und Vorratswirtschaft wird Brommethan weltweit als Fungizid, Nematozid und Insektizid zur Begasung von Lager- und Vorratsräumen eingesetzt. Dabei steht Methylbromid an der Spitze aller Begasungsmittel. In Großbritannien z.B. wurden 1966 insgesamt 248514 t Nahrungs- und Futtermittel begast, davon 182019 t (=73%) mit CH_3Br (Infestation Control, 1969).

Da Methylbromid wasserunlöslich ist und nur sehr wenig absorbiert wird, kann es auch bei wasserreichen Frischwaren wie Obst, Kartoffeln, Gemüse u.a. zur Bekämpfung von Pilzen, Insekten und Milben eingesetzt werden (Römpp, 1974), ohne daß es in der dabei verwendeten Konzentration von 10-50 mg/l die zur Entwesung bestimmten Waren beeinflußt (Biol. Bundesanstalt: Richtlinien, 1961).

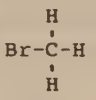
Obwohl Brommethan in Deutschland eine geringere Rolle spielt als z.B. in Großbritannien, wird es auch hier in großem Umfang eingesetzt:

a) Zur Mühlendurchgasung und Quarantänebegasung von Produkten aus der Ölgewinnung (Expeller), wobei es noch immer eines der wirksamsten Mittel gegen den unter Quarantäne stehenden Khaprakäfer (Trogoderma granarium) ist (Wohlgemuth, 1971,1982).

b) Zur Bodenentseuchung, wo es seit den 40er Jahren in Gebrauch ist. In den USA wird seine Wirkung sehr günstig beurteilt und Methylbromid wird relativ viel eingesetzt. Die besonders gute nematozide Wirkung wird hervorgehoben. In Deutschland ist es zwar nicht als Bodenentseuchungsmittel zugelassen, wird jedoch in der Praxis trotzdem bisweilen eingesetzt. Aus Sicherheitsgründen wird es dazu meist mit einem entsprechenden Anteil Chlorpikrin (2-30%) versetzt, weil dieses einen ausgeprägten Geruch besitzt (Volger, 1962).

2.1.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Methylbromid hat die Summenformel: CH_3Br
und die Strukturformel:



Es ist ein giftiges, farbloses, praktisch geruchloses (in höheren Konzentrationen jedoch chloroformähnlich riechendes), brennend schmeckendes Gas. Als Flüssigkeit ist es ebenfalls farblos und durchsichtig, mit Wasser nicht, mit Alkohol, Ether und Chloroform gut mischbar (Römpp, 1974).

Die Molekülmasse beträgt: 94,94,
die Dichte bei 0°C: D = 1,732 kg/l
bei 20°C: D = 3,974 g/l
(von Oettingen, 1964)

Der Schmelzpunkt von Brommethan liegt bei -94°C, der Siedepunkt bei +4°C (Römpp, 1974).

Der MAK-Wert ist auf 20 ppm (=80 mg/m³) festgelegt (Henschler, 1979).

An offener Flamme oder heißen Metalloberflächen erfolgt unter Zutritt von Luftsauerstoff eine Zersetzung. Dabei entstehen HBr, $COBr_2$, CO_2 und CO (Borbely, 1961).

Methylbromid ist praktisch nicht brennbar und bildet mit kaltem Wasser ein kristallines Hydrat. In wässriger Lösung findet eine langsame Hydrolyse statt, wobei Methanol und Hydrobromsäure (HBr) gebildet werden (von Oettingen, 1964).

CH_3Br besitzt am Brom-Atom eine effektive negative Ladung von $-0,87 \cdot 10^{-10}$ esu (elektrostatische Einheiten), das heißt, daß das Brom-Atom relativ schwer abzuspalten ist, schwerer jedenfalls als I in CH_3I ($-0,74 \cdot 10^{-10}$ esu) aber leichter als Cl in CH_3Cl ($-0,99 \cdot 10^{-10}$ esu). Im Vergleich dazu hat CCl_4 eine Ladung von $-0,39 \cdot 10^{-10}$ esu an den Chlor-Atomen (Dailey, 1960).

2.1.3 Stoffwechselverhalten

2.1.3.1 Resorption

In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, daß die Resorption von Methylbromid über die Lunge am raschesten erfolgt, die pulmonale Aufnahme also den wichtigsten Ingestionsweg darstellt. Daneben ist eine Aufnahme über den Magen-Darm-Kanal gesichert (Borbely, 1961; von Oettingen, 1964).

Eine Resorption über die intakte Haut ist noch umstritten, wird jedoch von einigen Autoren, wie Jordi (1953) postuliert, von anderen aber abgelehnt (von Oettingen, 1964).

2.1.3.2 Verteilung im Organismus

Flüchtiges Brom, wie es frühere Wissenschaftler in verschiedenen Organen von Meerschweinchen festgestellt haben, tritt nur wenige Stunden nach der Aufnahme von Methylbromid vorübergehend auf (von Oettingen, 1964). Dagegen ist nicht-flüchtiges Bromid längere Zeit im Organismus nachweisbar (von Oettingen, 1964, 1955). Es wird wegen der

guten Fettlöslichkeit von Methylbromid bevorzugt in Organen abgelagert, die einen hohen Fettgehalt aufweisen (Duvoir et al., 1939). Einzelheiten über die Bromidverteilung in je 100 g Gewebeproben eines an Methylbromidvergiftung gestorbenen Menschen berichtet von Oettingen (1964):

Lunge	380 ppm
Leber	560 ppm
Gehirn	620 ppm
Gemisch aus Herz, Milz, Niere	320 ppm

Kein Bromid oder nur Spuren konnten dagegen in Knochenmark, Pankreas, Milz, Hoden, Nebenniere und Schilddrüse gefunden werden (Duvoir et al., 1939).

2.1.3.3 Metabolisierung

Nach Verabreichung von Brommethan an Kaninchen konnten Irish et al. (1941) einen deutlichen Anstieg von Bromid im Blut nachweisen, was sie mit einer teilweisen Spaltung des resorbierten CH_3Br erklärten. Diese Befunde wurden auch von Miller und Haggard (1943) bestätigt.

Später fand man, daß Methylbromid bevorzugt mit Sulfhydrilgruppen im Organismus reagiert (Lewis, 1948):

$$R\text{-}SH + CH_3Br \longrightarrow R\text{-}S\text{-}CH_3 + HBr$$

Dabei werden Bromwasserstoff bzw. Bromide gebildet (Lewis, 1948).

Ob dagegen Brommethan im Körper hydrolytisch zu Bromid und Methanol gespalten wird (welches bei Primaten zu Formaldehyd oxidiert werden kann; Miller und Haggard, 1943) bedarf noch der Klärung (von Oettingen, 1955).

2.1.3.4 Ausscheidung

Die Ausscheidung von Methylbromid über die Lunge setzt relativ schnell ein und findet entsprechend den Diffusionsgesetzen für Gase statt (Miller und Haggard, 1943; von Oettingen, 1955). Ein Teil des metabolisierten Brommethans wird jedoch als Bromid im Urin ausgeschieden (Clarke et al., 1945).

Die vollständige Ausscheidung von Bromid dauert lange (von Oettingen, 1955). So fand man noch 12 Tage nach einer akuten CH_3Br-Vergiftung 6,9 mg Bromid in 100 ml Blut wie am ersten Tag und nach 31 Tagen noch 0,8 mg/100 ml. Erst nach 39 Tagen konnte kein Bromid mehr im Blut nachgewiesen werden (Clarke et al., 1945).

2.1.4 Toxikologische Eigenschaften

Methylbromidvergiftungen können auf folgende Weise zustande kommen:

- Einatmung von gasförmigem Methylbromid,
- unmittelbares Einwirken von flüssigem Methylbromid auf die Haut,
- mittelbares Einwirken von flüssigem Methylbromid, z.B. durch Benetzung von Kleidern o.ä. und schließlich
- längere Einwirkung von gasförmigem Methylbromid auf die Haut (Biologische Bundesanstalt, 1961).

Die meisten Vergiftungen mit Methylbromid entstehen als akute Vergiftung durch Aufnahme einer großen Menge der Substanz. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit einer kumulativen Wirkung, wenn mehrmals subtoxische Dosen eingeatmet werden (Borbely, 1961).

Methylbromid ist ein gefährlicheres Gift als Blausäure, obwohl es keine so starke a k u t e Giftwirkung besitzt. Seine Wirkung hängt neben der Dauer und Konzentration auch von der Häufigkeit der Einwirkung ab (Biol. Bundesanstalt, 1961).

Sehr gefährlich ist sowohl kurzes Einwirken hoher Konzentrationen als auch längeres Einwirken niedriger Dosen. Wegen der langsamen Eliminierung kann es leicht zu einer kumulativen Wirkung durch subtoxische Dosen kommen, die zu schweren Vergiftungen führt (Borbely, 1961). Es kann auch Tod als Folge von Spätschäden eintreten (von Oettingen, 1964).

Die toxischen Wirkungen des Methylbromids sind vor allem auf seine alkylierenden Eigenschaften zurückzuführen. So werden z.B. SH-haltige Enzyme durch Methylierung ihrer Sulfhydrilgruppen gehemmt. Beispiele sind die Urease, Succinyl-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Oxidase etc. (Lewis, 1948; Collins, 1965).

Mit seiner Eigenschaft, Hexokinasen zu blockieren, die besonders im Gehirn vorkommen, wird auch die toxische Wirkung von Methylbromid auf das Gehirn erklärt (Dixon und Needham, 1946; Collins, 1965).

Vergiftungssymptome: Flüssiges Brommethan verursacht in größeren Mengen auf der Haut schwere Verbrennungen 2. Grades durch Verdampfen. Es kann auch durch Hautläsionen in die Blutbahn gelangen und so starke allgemeine Vergiftungssymptome bewirken (Biol. Bundesanstalt, 1961).

Konzentrationen ab 8000 ppm verursachen Prickeln, Juckreiz, Rötungen, Blasenbildung und eventuell Gefühllosigkeit. Kleinere Mengen flüssigen Methylbromids sind ungefährlich, da sie sehr rasch verdampfen (von Oettingen, 1964).

Beim Einatmen fehlen im allgemeinen subjektive Vergiftungssymptome, so daß die Gefahr nicht zu erkennen ist (Borbely, 1961), obwohl bei der Aufnahme geringer Mengen ein unangenehmer Geschmack im Mund entstehen soll (Viner, 1945).

Die symptomlose Latenzzeit nach einer Methylbromidbelastung variiert von 30 Minuten bis 48 Stunden (Borbely, 1961).

An Vergiftungssymptomen überwiegen solche des ZNS, z.B. extreme Müdigkeit, Sehstörungen (evtl. temporäre Erblindung), Kopfschmerzen, Ohrensausen, Schwindel, Muskelzuckungen (bis zu epileptiformen Anfällen) und Paresen. In schweren Fällen treten auch Erbrechen und Atemstörungen auf. Man findet gelegentlich auch Zeichen einer Leberschädigung (Ikterus), ebenso Proteinurie, Zylindrurie, Hämaturie und sogar Anurie von 24-48stündiger Dauer (Borbely, 1961; Collins, 1965).

Zu Todesfällen kann es durch Lungenödem mit Herzdilatation und anschließendem Herz-Kreislaufversagen kommen (von Oettingen, 1964).

Diagnose: Es kann nicht von der Höhe des Bromid-Blutspiegels auf die Schwere der CH_3Br-Vergiftung geschlossen werden, wie es bei anorganischem Bromid der Fall ist (von Oettingen, 1964), vielmehr können bei Methylbromid--Vergiftungen die Bromid-Blutspiegel stark schwanken (Clarke et al., 1945; Viner, 1945; Rathus und Landy, 1961; Gay, 1962).

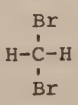
2.2 Dibrommethan (Methylenbromid)

2.2.1 Verwendung und praktische Bedeutung

Dibrommethan wird meistens als Lösungsmittel in der chemischen Industrie verwendet, steht jedoch seiner Bedeutung nach hinter dem weit verbreiteten Dichlormethan zurück (Römpp, 1974).

2.2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Dibrommethan hat die Summenformel: CH_2Br_2
und die Strukturformel (Römpp, 1974):



Die Molekülmasse beträgt 173,86

Es handelt sich bei Methylenbromid um eine bei Zimmertemperatur farblose Flüssigkeit mit einem Schmelzpunkt von -52°C und einem Siedepunkt bei 97°C. Die Dichte beträgt: 2,497 kg/l (Römpp, 1974).

Methylenbromid ist in Wasser zu 1,173 g/100 g bei 0°C löslich (von Oettingen, 1955); es ist gut mischbar mit organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Ether und Aceton (Römpp, 1974).

Da nur zwei Wasserstoffatome des Methans durch Bromatome substituiert sind, ist die effektive negative Ladung an den Halogenatomen mit $-0{,}59 \cdot 10^{-10}$ esu im Vergleich zu anderen Halomethanen relativ hoch, so daß eine Radikalbildung durch Bromabspaltung wenig wahrscheinlich ist (Reynolds, 1972).

2.2.3 Stoffwechselverhalten

2.2.3.1 Resorption

Verabreicht man einem Kaninchen rektal 10 ml CH_2Br_2, in gleicher Menge Olivenöl, so kann man schon nach 30 Minuten ausgeprägte Wirkungen auf den Gesamtorganismus feststellen (Lucas, 1928). Eine rektale Resorption von Dibrommethan ist also nachweisbar (von Oettingen, 1955).

2.2.3.2 Verteilung im Organismus und Metabolisierung

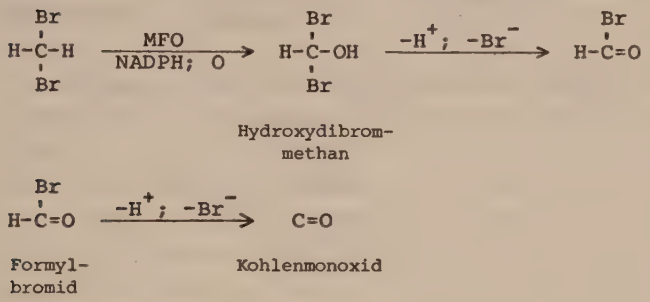
Nach Ahmed et al. (1980) bedürfen die bromierten Methanderivate, ausgenommen das spontan alkylierende Methylbromid, im Organismus einer metabolischen Aktivierung, ehe sie eine toxische Wirkung entfalten können.

Über die Metabolisierung von Dibrommethan liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Schon Heppel und Porterfield (1948) stellten bei ihren Versuchen fest, daß Dibrommethan in Gewebeextrakten der Leber enzymatisch dehalogeniert wird, wobei Formaldehyd, Bromid-Ionen und Wasserstoff-Ionen entstehen.

Kubic et al. (1974) stellten bei in vivo-Versuchen den Abbau von CH_2Br_2 zu Kohlenmonoxid fest. Dieselben Autoren konnten später durch in vitro-Versuche nachweisen, daß

sowohl Kohlenmonoxid als auch die von Heppel und Porterfield (1948) beschriebenen Metaboliten von Leberzellen gebildet werden, wobei Kohlenmonoxid in der Mikrosomenfraktion entsteht und die übrigen Abbauprodukte im Zytosol (Kubic und Anders, 1975).

Die Metabolisierung von Dibrommethan zu CO soll folgendermaßen ablaufen (Ahmed et al., 1980):

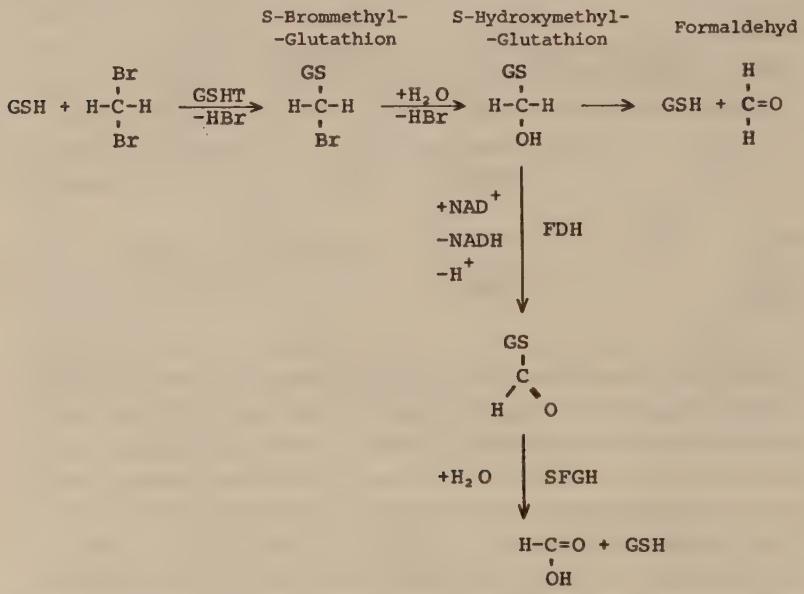


Die Initialreaktion dieses Abbauweges, die enzymatische Anlagerung eines atomaren Sauerstoffes, wird katalysiert von den mischfunktionellen Monooxygenasen und kann mit Kobaltchlorid, Proadifen und Diethylmaleinat gehemmt bzw. durch Phenobarbitalvorbehandlung der Versuchstiere stimuliert werden (Ahmed et al., 1980; Stevens et al.,1980). Die Sauerstoff- und NADPH-Abhängigkeit der CO-Bildung aus Dibrommethan ist schon von Kubic und Anders (1978) beobachted worden.

In quantitativer Hinsicht liefert ein Mol gasförmiges Methylenbromid 0,68 Mol Kohlenmonoxid (Rodkey und Collison, 1977).

Das bei der Metabolisierung von Dibrommethan anfallende Formylbromid kann nicht nur zu Kohlenmonoxid weiterreagieren, sondern ebensogut durch kovalente Bindung an nucleophile Gewebestrukturen, z.B. mikrosomale Proteine und Lipide, angelagert werden und diese acylieren (Anders et al., 1977; Ahmed et al., 1980):

Inzwischen ist auch der von Heppel und Porterfield (1948) beschriebene Abbau von Dibrommethan zu Formaldehyd näher untersucht worden (Ahmed et al., 1980):



wobei bedeuten:
GSH : Glutathion
GSHT: Glutathion-Transferase
FDH : Formaldehyd-Dehydrogenase
SFGH: S-Formyl-Glutathion-Hydrolase

Der erste Schritt ist ein "nucleophiler Angriff" von Glutathion auf eine Kohlenstoff-Brom Bindung unter Beteiligung der Glutathion-Transferase (Keen et al., 1976).

Das entstehende S-Brommethyl-Glutathion zerfällt rasch durch eine nichtenzymatische Hydrolyse zu S-Hydroxymethyl-Glutathion, welches wiederum mit Formaldehyd und Glutathion im Gleichgewicht steht (Ahmed und Anders, 1978).

Ist im Leberzell-Zytosol NAD^+ vorhanden, so entsteht durch eine enzymatische Dehydrierung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse auch Ameisensäure (Goodman und Tephly, 1971; Uotila und Koivusalo, 1974; Ahmed und Anders, 1978).

Bei beiden Reaktionen wird Glutathion nicht verbraucht, sondern nur als Katalysator benötigt (Ahmed und Anders, 1978).

Der Abbau von Dibrommethan zu Formaldehyd findet ausschließlich im Zytosol statt, da die erforderlichen Enzyme nur dort vorhanden sind. Er läuft außerdem fast ausschließlich in der Leber ab und nur in beschränktem Umfang in anderen Organen wie Lunge, Niere, Milz, Herz und Gehirn (Ahmed und Anders, 1976). Bedingt durch die entscheidende Rolle des Glutathion kann dieser Abbauweg auch nur mit solchen Substanzen blockiert werden, die fähig sind, Sulfhydrilgruppen zu binden (z.B. Diethylmaleinat), oder selbst Substrate von GSH-Transferasen sind (z.B. p-Nitrobenzylchlorid oder Jodomethan) (Ahmed und Anders, 1976).

Außer dem beschriebenen wurden auch noch andere Metabolisierungswege beschrieben, die zu Ameisensäure führen (Goodman und Tephly, 1971).

2.2.4 Toxikologische Eigenschaften

Die LD_{50} von Dibrommethan nach einmaliger subcutaner Verabreichung an Mäuse wird mit 21,5 mmol pro kg Körpermasse und 10 Tagen, d.h. ca 3740 mg/kg Körpermasse, angegeben (Kutob und Plaa, 1962). Methylenbromid hat also eine relativ geringe akute Toxizität. Dies mag erklären, weshalb akute Dibrommethanvergiftungen beim Menschen anscheinend nicht bekannt sind (von Oettingen, 1955).

Die toxischen Eigenschaften von Dibrommethan lassen sich auf verschiedene Mechanismen zurückführen:

Von Bedeutung ist offenbar die schon erwähnte Metabolisierung zu Kohlenmonoxid, das als Blutgift bekannt ist und den Sauerstofftransport zu den Körpergeweben infolge Reaktion zu CO-Hämoglobin blockiert. Die Bedeutung der CO-Bildung ergibt sich aus Untersuchungen von Kubic et al. (1974), die bei Ratten 4 bis 5 Stunden nach intraperitonealer Verabreichung von 3 mmol CH_2Br_2 eine 14 %ige Sättigung des Blutes mit CO-Hämoglobin beobachtet haben. Vergleichbare Befunde sind von Stewart et al.(1972a, 1972b) nach der Inhalation von Dichlormethan (das gleichfalls zu Kohlenmonoxid metabolisiert wird) auch beim Menschen beobachtet worden. Im Zusammenhang mit der metabolischen Giftung von Dibrommethan zu CO mag von Interesse sein, daß Dibrommethankonzentrationen in der Größenordnung des MAK-Wertes CO-Hämoglobinkonzentrationen bei Menschen verursachen, die höher sind als nach der Exposition in CO-Konzentrationen, die dem MAK-Wert des Kohlenmonoxids entsprechen (Kubic und Anders, 1975).

Abgesehen von den toxischen Wirkungen des metabolisch gebildeten Kohlenmonoxids, wird auch der dabei anfallende Bromwasserstoff (s.oben), bzw. die mit Wasser entstehende Bromwasserstoffsäure, für einige Schadwirkungen des Dibrommethan, z.B. seine "hepatotoxic action", verantwortlich gemacht (von Oettingen, 1955).

Ein weiterer Schädigungsmechanismus des Dibrommethan scheint mit seiner skizzierten Metabolisierung zu Formaldehyd zusammenzuhängen. Das dabei als instabiles Intermediat entstehende S-Brommethyl-Glutathion (s. oben) hat nämlich alkylierende Eigenschaften, welche u.a. die karzinogene Wirkung des Dibrommethan zu erklären vermögen (Reynolds und Yee, 1967; Ahmed und Anders, 1978).

Keine Rolle scheint dagegen die metabolische Bildung von Dibrommethanradikalen zu spielen. Dies wird zumindest von Reynolds (1972) aufgrund früherer Untersuchungen (Reynolds und Yee, 1967) angenommen, bei welchen Dibrommethan keine zentrilobulären Lebernekrosen (als Folge einer radikalischen Schädigung der hier lokalisierten mischfunktionellen Monooxygenasen; s. oben) verursacht hat.

Vergiftungssymptome: Die Vergiftungssymptome von Dibrommethan sind in der Literatur nur spärlich beschrieben und müssen als relativ unspezifisch bezeichnet werden. Von Lucas (1928) wird nach rektaler Verabreichung von 10 ml der Substanz an Kaninchen über Kaubewegungen, Speicheln, Schleimsekretion in der Trachea sowie Hyperämie der Lunge und Hämaturie berichtet.

2.3 Tribrommethan (Bromoform)

2.3.1 Verwendung und praktische Bedeutung

Bromoform wurde früher bei Keuchhusten und vor Einführung der Barbiturate auch zur Beruhigung eingesetzt (von Oettingen, 1955; Römpp, 1974).

Als Inhalationsanästheticum ist es wegen seines geringen Dampfdruckes nicht geeignet (von Oettingen, 1955).

Heute hat Tribrommethan eine gewisse Bedeutung als Umweltschadstoff erlangt. So konnten Bätjer et al. (1979) erhebliche Mengen Tribrommethan (25 - 40 ppb) neben anderen Haloformen in gechlortem Trinkwasser feststellen, das aus Oberflächenwasser bereitet wurde. Dieselben Autoren stellen

auch die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der Krebssterblichkeitsrate und dem Auftreten von halogenierten Kohlenwasserstoffen im Trinkwasser bestimmter Regionen.

In der chemischen Industrie wird Bromoform nur sehr wenig eingesetzt; eine gewisse Bedeutung hat es bei der Trennung von Mineralgemischen (Römpp, 1974).

2.3.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Tribrommethan hat die Summenformel: $CHBr_3$
und die Strukturformel:

Die Molekülmasse beträgt: 252,77,
die Dichte: 2,820 kg/l (Römpp, 1974).

Der Schmelzpunkt des Tribrommethan liegt bei 5-6°C, der Siedepumkt bei 148-150°C (Römpp, 1974).

Bromoform ist bei Zimmertemperatur eine farblose Flüssigkeit mit chloroform-ähnlichem Geruch, die in Wasser nur schwer (0,1 ml/100 ml Wasser; von Oettingen, 1955), in Alkohol, Ether und anderen organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich ist (Römpp, 1974).

Durch die drei Bromatome am Kohlenstoff nimmt die effektive negative Ladung an den Halogenatomen mit $-0{,}42 \cdot 10^{-10}$ esu einen Mittelplatz unter den halogenierten Methanderivaten ein (Reynolds, 1972). Auf die Bedeutung dieses Umstandes für die Radikalbildung hat Reynolds (1972) hingewiesen.

2.3.3 Stoffwechselverhalten

2.3.3.1 Resorption

Eine Resorption von Tribrommethan ist über die Lunge und den Gastrointestinaltrakt möglich, in beschränktem Ausmaß auch über die intakte Haut (von Oettingen, 1955).

2.3.3.2 Verteilung im Organismus

Über die Tribrommethanverteilung im Organismus berichtet Roth (1904) anhand einer tödlichen Bromoformvergiftung eines fünfjährigen Knaben (zit. nach von Oettingen, 1955):

Magen	1330 ppm
Darm mit Inhalt	420 ppm
Leber	300 ppm
Nieren	100 ppm
Gehirn	310 ppm
Lunge	910 ppm

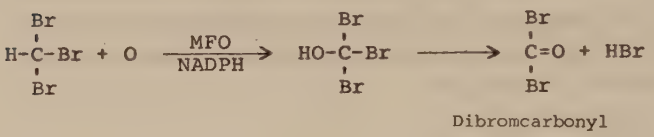
2.3.3.3 Metabolisierung

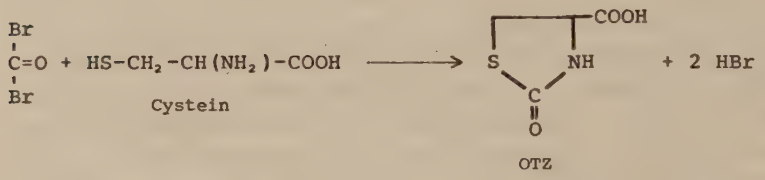
Die Untersuchung der Metabolisierung von Haloformen hat schon früh begonnen. Beispielsweise konnte Zeller schon im Jahre 1883 zeigen, daß Tiere nach einer Chloroformbelastung vermehrt anorganisches Chlor ausscheiden.

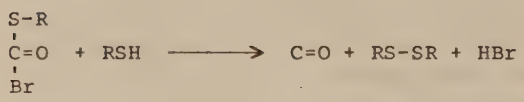
Neuere Untersuchungen mit ^{13}C-Bromoform haben ergeben, daß Tribrommethan im Säugerorganismus zu Kohlenmonoxid und anorganischem Bromid abgebaut wird (Fodor und Roscovano, 1976; Ahmed et al., 1977; Anders et al., 1977 und 1978; Stevens und Anders, 1979). Der Abbau erfolgt, wie in vitro-Versuche von Ahmed et al. (1977) unter Verwendung von Enzyminduktoren und Enzymhemmstoffen zeigten, durch die mischfunktionellen Monooxygenasen der Leber. Dies konnte später auch in vivo nachgewiesen werden (Anders et al., 1978).

Neben Kohlenmonoxid und anorganischem Bromid sind als weitere Metaboliten von Bromoform Kohlendioxid (Stevens und Anders, 1979; Ahmed et al., 1980) und 2-Oxathiazolidin--4-carbonsäure (OTZ) nachgewiesen worden (Ahmed et al., 1980).

Damit läßt sich die Metabolisierung von Bromoform folgendermaßen zusammenfassen (Ahmed et al., 1980):





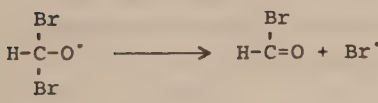


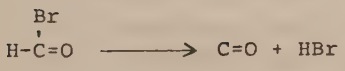
Das vorstehende Abbauschema zeigt, daß dem Dibromcarbonyl eine zentrale Stellung bei der Biotransformation von Tribrommethan zukommt: Es kann einerseits zu Kohlendioxid

und anorganischem Bromid hydrolysiert werden und sich andererseits mit Cystein zu 2-Oxathiazolidin-4-carbonsäure umsetzen. Darüber hinaus führt die Reaktion mit Thiolen - auch Glutathion - zu Kohlenmonoxid. Dies erklärt, weshalb die Kohlenmonoxidbildung nur in Gegenwart einer hinreichenden Konzentration von Sulfhydrylgruppen abläuft (Ahmed et al., 1980) und zum Beispiel erst bei einer Konzentration von 0,5 mM maximal ist (Stevens und Anders, 1978 und 1979). Diese GSH--Konzentration ist in der Leber jedoch meist um mehr als den Faktor zehn überschritten (5-8 mM), so daß als Hauptmetabolit des Bromoforms Kohlenmonoxid gebildet wird (Stevens und Anders, 1978 und 1979).

Neben diesen Metabolisierungsmöglichkeiten scheint Bromoform im Organismus auch noch zum Dibrommethylester der Hypobromsäure oxidiert zu werden,

welcher über radikalische Zwischenstufen schließlich zu Kohlenmonoxid und anorganischem Bromid zerfallen kann (Isaacs, 1974; Kubic und Anders, 1978; Stevens und Anders, 1979):





2.3.3.4 Ausscheidung

Bromoform wird zum Teil unverändert über die Lunge ausgeschieden, was sich in einem charakteristischen Geruch der Exspirationsluft bemerkbar macht (von Oettingen, 1955). Das bei der Metabolisierung entstandene Bromid gelangt über die Nieren zur Ausscheidung und konnte mehrere Tage lang im Urin nachgewiesen werden (von Oettingen, 1955).

2.3.4 Toxikologische Eigenschaften

Bromoform besitzt die geringste akute Toxizität aller Haloforme (Chu et al., 1980).

Seine subcutane LD_{50} für Mäuse beträgt 7,2 mmol (ca. 1820 mg) pro Kilogramm Körpermasse bei zehntägiger Nachbeobachtungszeit (Kutob und Plaa, 1962).

Bei Ratten macht Bromoform in einer oralen Dosis von 26 nmol (ca. 6,6 mg) pro Kilogramm Körpermasse tiefe Anästhesie; die orale Gabe von 8,3 nmol (ca. 2,1 mg) pro Kilogramm Körpermasse verursachte nach zwei Stunden einen Konzentrationsanstieg von konjugierten Dienen in den Lebermikrosomen (Reynolds, 1972).

Bei Versuchen mit Kaninchen zeigte sich, daß die subcutane Injektion von 0,066 ml (ca. 0,19 mg) Tribrommethan pro Kilogramm Körpermasse eine leichte Narkose hervorruft, während 0,41 ml/kg (ca. 1,2 mg/kg) tiefe Allgemeinanästhesie mit Todeseintritt nach 6 Stunden zur Folge hatten (von Oettingen, 1955). Gleichfalls zum Tod führte die wiederholte Injektion von 0,066 ml/kg am zweiten Tag nach der Applikation (von Oettingen, 1955).

Beim Hund ergab die 20minütige Inhalation von 20 ml Bromoform (ca. 56 g) in 100 l Luft eine tiefe Narkose mit Todesfolge nach einstündiger Exposition (Merzbach, 1928; zit. nach von Oettingen, 1955).

Die toxischen Eigenschaften von Haloformen wurden von früheren Untersuchern auf die bei der Dehalogenierung entstehenden Halogen-Wasserstoffsäuren zurückgeführt (Graham, 1915). Daneben dürfte das aus Bromoform metabolisch

entstehende Dibromcarbonyl eine Rolle spielen, da es eine hohe Reaktionsfähigkeit besitzt und kovalent an Leberproteine sowie -lipide gebunden werden kann (Reynolds und Yee, 1967; Nash und Prattle,1971; Stevens und Anders, 1979; Ahmed et al., 1980). Schließlich sollte auch eine metabolische Bildung von Bromoformradikalen und Radikalfolgeprodukten mit oxidativer Schädigung zellulärer und subzellulärer Membranen sowie sonstiger Strukturen angesichts der oben erwähnten Dienkonjugation in den Lebermikrosomen bromoformexponierter Ratten (Reynolds, 1972) in Erwägung gezogen werden.

Vergiftungssymptome: Bromoform verursacht bei jeder Applikationsart eine zentrale Depression und in höheren Dosen Allgemeinanästhesie mit vollständiger Muskelerschlaffung (von Oettingen, 1955). Der Narkoseeintritt erfolgt langsamer als bei Chloroform, verläuft ohne Excitationsstadium und soll Blutdruck und Atmung nur wenig beeinflussen (von Oettingen, 1955). Am isolierten Froschherzen verursacht Bromoform jedoch in 2,87 mmolarer Konzentration (ca. 725 mg/l) in der Perfusionslösung einen Herzstillstand nach 9 Minuten (Merzbach, 1928).

Nach oraler Aufnahme von Bromoform werden beim Menschen folgende klinische Vergiftungssymptome beschrieben: Brennendes Gefühl auf der Mundschleimhaut, Kopfschmerzen, Schwindelgefühl und Schläfrigkeit; höhere Dosen verursachen Ataxie, Muskelerschlaffung und Hypothermie. Eine schwere Vergiftung ist durch Bewußt- und Reflexlosigkeit, gelegentlich auch Trismus und Krämpfe, Lungenödem und Atemstillstand gekennzeichnet (von Oettingen, 1955; Chu et al., 1980).

An morphologischen Vergiftungssymptomen sind bei Hunden nach einer Bromoformnarkose beschrieben worden (Lucas, 1928; Merzbach, 1928):

- eine lokale Irritation der Atemwege mit Exsudation in Trachea und Lunge,
- Hyperämie der Lunge und sonstiger Organe sowie Hämorrhagien in den Schleimhäuten des Verdauungskanals und

- eine fettige Leberdegeneration, deren Intensität mit der Narkosetiefe korreliert ist.

Die hepatotoxische Wirkung des Bromoforms wird mehrfach bestätigt (Kutob und Plaa, 1962; Bowman et al., 1978); sie wird mit etwa 8% der lebertoxischen Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs veranschlagt (Kutob und Plaa, 1962) und kommt auch in einer dosisabhängigen Abnahme der Phagozytoserate in der Leber zum Ausdruck (Munson et al., 1978).

Die chronische Anwendung von Bromoform hat beim Menschen Bromismus verursacht (Lewin, 1929). Es handelt sich dabei um

a) eine zentrale Depression mit:
   - Somnolenz, Teilnahmslosigkeit, Verwirrtheit bis zu Halluzinationen etc. und
   - Muskelschwäche, Tremor, Inkoordination sowie ggf. Festliegen

b) eine Ausscheidungstoxikose mit lokaler Reizwirkung an:
   - der Haut in Form von Akne und Furunkulose etc. bzw.
   - den Schleimhäuten mit Konjunktivitis, Rhinitis, Bronchitis, ggf. Pneumonie; Gastro-Enteritis usw.

Schließlich muß noch erwähnt werden, daß Bromoform das größte kanzerogene Potential aller Trihalomethanderivate besitzt (Bätjer et al., 1979), was angesichts der erwähnten hohen Reaktions- und Bindungsfähigkeit verschiedener Bromoformmetaboliten (Dibromcarbonyl,Radikale?) nicht überraschend ist.

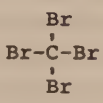
2.4 Tetrabrommethan (Tetrabromkohlenstoff)

2.4.1 Verwendung und praktische Bedeutung

Tetrabrommethan läßt sich aus Aceton und Natriumhypobromid darstellen (Beyer, 1981) und findet zur Bromierung chemischer Verbindungen Verwendung (Römpp, 1974).

2.4.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Tetrabromkohlenstoff hat die Summenformel: CBr_4
und die Strukturformel:



Die Molekülmasse beträgt: 331,65 (Römpp,1974).

Bei Zimmertemperatur liegt Tetrabrommethan als kristalline Festsubstanz aus farblosen monoklinen Kristallen (Römpp, 1974) mit einem charakteristischen Geruch vor (von Oettingen, 1955). Sein Schmelzpunkt liegt bei 91°C,
der Siedepunkt bei 189°C.

Tetrabromkohlenstoff ist in Wasser fast nicht, in Ether, Alkohol und Chloroform jedoch löslich (Römpp, 1974).

2.4.3 Stoffwechselverhalten

2.4.3.1 Resorption

Tetrabrommethan wird in Dampfform pulmonal resorbiert, wobei Resorptionsgeschwindigkeit und -umfang hoch sind (von Oettingen, 1955).

Nach oraler Aufnahme findet nur eine langsame und beschränkte Resorption von Tetrabrommethan statt (von Oettingen, 1955).

2.4.3.2 Verteilung im Organismus und Metabolisierung

Tetrabrommethan wird im Organismus nur sehr langsam umgesetzt; die Rate der Biotransformation ist niedrig. Das mag mit darauf zurückzuführen sein, daß CBr_4 in den Körperflüssigkeiten nur wenig löslich ist (Klingensmith und Mehendale, 1981).

2.4.3.3 Ausscheidung

Entsprechend konnten bei einigen durchgeführten Untersuchungen nur Spuren von Bromid im Urin festgestellt werden, wofür nach oraler Aufnahme sowohl die schlechte Resorption (von Oettingen, 1955) als auch die geringe Metabolisierungsrate (Klingensmith und Mehendale, 1981) verantwortlich sein mag.

2.4.4 Toxikologische Eigenschaften

Die LD_{50} von Tetrabrommethan nach einmaliger subcutaner Verabreichung einer öligen Lösung der Substanz an Mäuse wird mit 0,9 mmol pro Kilogramm Körpermasse (KM) (ca. 298,5 mg/kg KM) angegeben, bei einer Nachbeobachtungszeit von zehn Tagen (Kutob und Plaa, 1962).

Reynolds (1972) konnte bei seinen Untersuchungen starke membranschädigende Eigenschaften von Tetrabrommethan auf das endoplasmatische Retikulum und die konjugierten ungesättigten Lipide in Leberzellen von Ratten nachweisen, wobei CBr_4 mit die stärksten Effekte aller geprüften Halomethane hatte. Dies scheint mit seiner leichten Metabolisierbarkeit zu Radikalen zusammenzuhängen, welche nach Reynolds (1972) mit der Gleichverteilung der Bromatome am Kohlenstoff bzw. einer relativ kleinen effektiven Ladung an den einzelnen Bromatomen von $-0{,}31 \cdot 10^{-10}$ esu korreliert ist. Entsprechend berichten Kutob und Plaa (1962), daß Tetrabrommethan stärker lebertoxisch wirkt als Tetrachlorkohlenstoff.

Vergiftungssymptome: Die orale Verabreichung von 3 g Tetrabrommethan (in H_2O suspendiert) verursachte bei einem 1,3 kg schweren Kaninchen sofortigen Atemstillstand, der nur durch künstliche Beatmung überwunden werden konnte. Das Tier erholte sich vorübergehend, wurde jedoch später depressiv, appetitlos und starb nach 48 Stunden (von Oettingen, 1955).

Kleinere Dosen hatten denselben Effekt auf die Atmung, jedoch erholten sich die Tiere nach künstlicher Beatmung. Ein kleineres Kaninchen, das den Dämpfen von Tetrabrommethan ausgesetzt wurde, zeigte schon nach wenigen Minuten Paralyse, Atemdepression, Cyanose und nahm Seitenlage ein. Es erholte sich jedoch innerhalb von 5 Minuten nach Absetzen der Dämpfe (von Oettingen, 1955).

Die Sektion zeigte schwere Veränderungen am Magen und oberen Verdauungskanal, der Urin enthielt Spuren von Bromid (von Oettingen, 1955).

III EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1 Experimentelle Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die halogenierten Methanderivate Mono-, Di-, Tri- und Tetrabrommethan radikalbildende Eigenschaften in vivo besitzen.

Dazu ist die Exspirationsluft von Versuchstieren nach Applikation der Brommethanderivate gaschromatographisch auf flüchtige Kohlenwasserstoffe untersucht worden (Riely et al., 1974). Diese treten als Zerfallsprodukte radikalgeschädigter Zellmembranen in der Exspirationsluft von Versuchstieren auf. Darüber hinaus ist als weiteres Zerfallsprodukt von Lipidperoxiden Malondialdehyd in der Leber photometrisch bestimmt worden (Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976; Terao und Matsushita, 1981).

2 Versuchsplan

Über Anlage und Bedingungen der im o.g. Zusammenhang durchgeführten Versuche gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tab. 1: Versuchsanlage und Versuchshäufigkeiten

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-	+	-	-	-	-	-	-	-	3
-	+	-	-	-	-	-	-	+	3
+	+	-	-	-	-	-	-	-	3
-	+	-	+	-	-	-	-	-	3
+	+	-	+	-	-	-	-	-	8x3
+	-	-	+	-	-	-	+	-	6x3

Fortsetzung Tabelle 1:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-	+	-	-	+	-	-	-	-	8x3
+	+	+	-	-	-	-	-	-	2x3
+	+	-	-	+	-	-	-	-	7x3
+	-	-	-	+	-	-	+	-	6x3
-	+	-	-	-	+	-	-	-	3
+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
+	+	-	-	-	+	-	-	-	8x3
+	-	-	-	-	+	-	+	-	6x3
-	+	-	-	-	-	+	-	-	3
+	+	+	-	-	-	-	-	-	3
+	+	-	-	-	-	+	-	-	7x3
+	-	-	-	-	-	+	+	-	6x3

1: Tierversuch; 2: synthetische Luft mit 20 Vol% O_2;
3: Paraffinverabreichung; 4: Monobrommethanverabreichung;
5: Dibrommethanverabreichung; 6: Tribrommethanverabreichung;
7: Tetrabrommethanverabreichung; 8: synthetische Luft mit modifiziertem O_2-Gehalt; 9: Referenzgasapplikation in den Exsikkator; 10: Versuchshäufigkeit; +: ja; -: nein;

3 Untersuchungsmethodik

3.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und -fütterung

Als Versuchstiere dienten konventionell gehaltene männliche weiße Mäuse aus der Zucht des Instituts. Ihre durchschnittliche Körpermasse betrug 30 g.

Die Tiere wurden mit Futter und Wasser ad libitum versorgt und erhielten bis zum Versuchsbeginn die Haltungsdiät für Mäuse und Ratten der Firma ALMA, Kempten im Allgäu und aqua font.

Das Futter hatte laut Hersteller folgende Zusammensetzung bzw. Eigenschaften:

Umsetzbare Energie 1130 Joule/g

Zusammensetzung (Masse in % der Diät)

Mais	32,0
Weizen	20,0
Sojaschrot, extr.	18,0
Maisarin	10,0
Luzernegrüngrasmehl	6,0
Fischmehl	3,0
Melasse	3,0
Dorschmehl	2,0
Mineralstoffmischung	2,0
Vitamin-Vormischung	2,0
Magermilchpulver	1,0
Futterfett	1,0
	100,0

Rohnährstoffe (Masse in % der Diät)

Rohprotein	20,0
Rohasche	7,0
Rohfaser	5,0
Rohfett	4,0

Mineralstoffe (g/kg Diät)

Calcium	10,0
Phosphor	7,4
Natrium	5,1
Magnesium	2,4
Kalium	9,3

Spurenelemente (mg/kg Diät)

Eisen	50
Mangan	50
Zink	12
Kupfer	5
Jod	0,2

Vitaminzusätze (mg/kg Diät, wenn nicht anders angegeben)

Vitamin A	15000	I.E./kg
Vitamin D_3	500	I.E./kg
Vitamin E	150	
Vitamin K_3	10	
Vitamin B_1	10	
Vitamin B_2	20	
Vitamin B_6	15	
Vitamin B_{12}	30	mcg/kg
Ca-D-Panthothenat	50	
Nicotinsäure	50	
Cholin	1000	
Folsäure	5	
Biotin	60	mcg/kg
Vitamin C	50	

Aminosäuren (g/100 g Rohprotein)

Lysin	6,1	
Lysin, verfügbar	2,8	
Methionin + Cystein	4,2	(50% Methionin)
Phenylalanin + Tyrosin	9,0	(60% Phenylalanin)
Arginin	6,8	
Histidin	2,4	
Tryptophan	1,3	
Threonin	4,0	
Isoleucin	4,7	
Leucin	9,4	
Valin	5,2	

3.2 Gewinnung der Exspirationsluft

Zur Gewinnung der Exspirationsluft der Versuchstiere diente ein Exsikkator aus Glas mit einem Leervolumen von 860 ml, welcher über ein Sperrventil an das drucklose Sauerstoffversorgungssystem angeschlossen werden konnte.

Der Exsikkator war vor Versuchsbeginn mit Atemkalk zur CO_2-Absorption beschickt, das absorbierte Volumen wurde kontinuierlich durch hochgereinigten Sauerstoff ersetzt.

Zur Gasentnahme aus dem Exsikkator wurde die Nadel einer leeren Gasspritze (HAMILTON, Darmstadt) durch ein Silikonseptum im Exsikkatordeckel gestochen und der Stempel mehrfach hin- und herbewegt. Danach wurden 10 ml Gas entnommen, wovon 3 ml im Gaschromatographen zur Analyse gelangten.

3.3 Versuchsdurchführung

Von den untersuchten Substanzen wurden Di-, Tri- und Tetrabrommethan so in Paraffin gelöst, daß das Applikationsvolumen 5 ml/kg Körpermasse betrug. Monobrommethan wurde als Gas verabreicht.

Jede Versuchsgruppe bestand aus 4 männlichen Mäusen.

Nach Wiegung der Tiere und intraperitonealer Applikation der Substanzlösungen bzw. des Gases wurde die Tiergruppe sofort in den Glasexsikkator verbracht, wo sie auf einem Drahtnetz über 100 g Atemkalk zur CO_2-Absorption saß. Das Nettovolumen des Exsikkators (Leervolumen minus Tier- und Atemkalkvolumen) betrug ca. 640 ml.

Anschließend erfolgte eine 5-minütige Spülung des Exsikkators inclusive Versuchstieren und Atemkalk mit synthetischer Luft, bzw. einem Gemisch aus N_2 und O_2 mit verschiedenem Sauerstoffpartialdruck und schließlich der Anschluß an die drucklose Sauerstoffversorgung über ein Sperrventil (Versuchsbeginn).

Die Entnahme einer Probe erfolgte üblicherweise nach 180 Minuten wie beschrieben.

Sollte die Kohlenwasserstoffakkumulation als Funktion der Zeit bestimmt werden, so wurden 6 Proben im Abstand von 30 Minuten gezogen.

3.4 Kohlenwasserstoffbestimmung

Zur Kohlenwasserstoffbestimmung im Exsikkatorgas diente ein Gaschromatograph der Firma CARLO ERBA STRUMENTAZIONE, Typ Fractovap 4100, unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors, der mit synthetischer Luft und Wasserstoff betrieben wurde.

Die Trennsäule war 5 m lang bei einem Innendurchmesser von 3 mm und hatte als Füllung 2% Carbowax auf Porasil C, der Korngröße 80 - 100 mesh. Die Arbeitstemperaturen betrugen bei der Säule 50°C und beim Detektor 120°C Zur Registrierung wurde ein Schreiber der Firma BBC (Servogor 210) an den Gaschromatographen angeschlossen. Als Trägergas diente nachgereinigter Stickstoff mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 30 ml/min.

Von den 10 ml der entnommenen Exsikkatorluftprobe kamen im Gaschromatographen 3 ml zur Analyse. Die darin enthaltene Menge der Kohlenwasserstoffe wurde vom Gerät in Form von Peaks aufgezeichnet, deren Höhe (Ethan und Ethen) bzw. Fläche (Pentan) ausgemessen und als Konzentrationsparameter ausgewertet wurde.

3.5 Malondialdehydbestimmung

Die Malondialdehydbestimmung erfolgte wie von Terao und Matsushita (1981) beschrieben. Dazu wurde nach Versuchsende jedem Tier ca. 0,5 g Leber entnommen, gewaschen und mit demselben Gewichtsanteil 0,8 %iger Thiobarbitursäure (TBA)-Lösung 60 Sekunden lang bei 15000 U/min. homogenisiert (ULTRA TURRAX).

Von dem gewonnenen Leberhomogenat wurden 0,5 ml entnommen, mit 2 ml 0,8 %iger TBA-Lösung, 2 ml 70 %iger Trichloressig-

säure (TCA)-Lösung und 1 ml Eisensulfatlösung (278 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ / 100 ml aqua dest.) versetzt und 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen im Wasserbad wurde das fehlende Volumen durch TCA-Lösung bis zum Ausgangsvolumen ergänzt, anschließend in 5 ml n-Hexan 30 Sekunden lang ausgeschüttelt und 5 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Durch die dabei erfolgte Phasentrennung konnte die überstehende n-Hexanphase mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden und die verbleibende wässerige Phase, die die thiobarbituratpositiven Substanzen enthält, im Photometer bei 535 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessen werden. Zur Auswertung gelangte die Extinktion als Konzentrationsparameter für Malondialdehyd.

3.6 Chemikalien, Lösungen und Gase

Bei der Durchführung der Versuche fanden folgende Chemikalien, Lösungen und Gase Verwendung.

a) Brommethan (CH_3Br) zur Synthese, Gehalt 99,5 %
MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn bei München

b) Dibrommethan (CH_2Br_2) zur Synthese, Gehalt 98 %
MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn

c) Bromoform reinst ($CHBr_3$), Gehalt 98 %
MERCK, Darmstadt

d) Tetrabromkohlenstoff (CBr_4) zur Synthese, Gehalt 98 %
MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn

e) Paraffin flüssig
MERCK, Darmstadt

f) Ethan (C_2H_6) in synth. Luft, Gehalt 1 µl/l, Prüfgas
LINDE, Unterschleißheim

g) Ethen (C_2H_4), 100 µl/l N_2, Prüfgas
LINDE, Unterschleißheim

h) n-Pentan (C_5H_{12}) zur Analyse, Gehalt mindestens 99 %
MERCK, Darmstadt

i) Atemkalk, Dräger-Sorb 800, CH 52
vor Versuchsbeginn 1 Stunde lang auf 100°C erhitzt
DRÄGERWERKE, Lübeck

k) Trichloressigsäure (CCl_3COOH) zur Analyse
Verwendung als 70 %ige wässrige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

l) 2-Thiobarbitursäure ($C_4H_4N_2O_2S$) Reagenz auf Sorbinsäure
Verwendung als 0,8 %ige wässrige Lösung (Masse/Volumen)
MERCK, Darmstadt

m) n-Hexan (C_6H_{14}) zur Analyse
MERCK, Darmstadt

n) Malondialdehyd-bis-(diethylacetal) ($C_{11}H_{24}O_4$) zur Synthese
MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn

o) Natriumchlorid kristallin (NaCl) zur Analyse,
Gehalt mindestens 99,5 %
MERCK, Darmstadt

4 Versuchsauswertung

Die Auswertung der erhaltenen Gaschromatogramme auf flüchtige Kohlenwasserstoffe erfolgte sowohl qualitativ als auch quantitativ. Die für Malondialdehyd spezifische Extinktion wurde quantitativ ausgewertet.

4.1 Qualitative Auswertung

Ziel der qualitativen Versuchsauswertung war es, die durch die applizierten Brommethanderivate entstandenen flüchtigen Kohlenwasserstoffe zu identifizieren.

Dazu sind die Gaschromatogramme von unbehandelten Kontroll- und behandelten Testgruppen verglichen und dosisabhängige Mehrpeaks bei den Testgruppen mit Hilfe von Referenzgasen durch Vergleich der Retentionszeit und "Spiking" (Peakvergrößerung durch Zumischung von Referenzgas) bestimmt worden.

4.2 Quantitative Auswertung

4.2.1 Eichkurven für flüchtige Kohlenwasserstoffe

Die quantitative Versuchsauswertung wurde mit Hilfe von Eichkurven vorgenommen, die aus der Peakgröße (Höhe bzw. Fläche) von fünf verschiedenen Verdünnungen der Referenzgase (Ethan, Ethen, Pentan) in synthetischer Luft mittels linearer Regressionsanalyse errechnet wurden. Dabei ergab sich in allen Fällen ein linearer Zusammenhang zwischen Peakgröße und Kohlenwasserstoffkonzentration in der Exspirationsluft.

Dieser Zusammenhang konnte durch die allgemeine Regressionsgleichung

$$F = a + bC \quad (E)$$

mit a,b: Konstanten (substanzspezifisch)

C: Kohlenwasserstoffkonzentration (µl/l = vpm)

F: Peakgröße (E)

E: Maßeinheit der Peakgröße (cm bzw. cm^2)

beschrieben werden. Die aus den erhaltenen Meßwerten berechneten gasspezifischen Konstanten, die Korrelationskoeffizienten (r) sowie die statistische Beurteilung

der Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2: Eichkurvenparameter für Ethan, Ethen und Pentan, sowie deren statistische Beurteilung

Substanz	a	b	r	p<
Ethan	0,20	92,55	0,9978	0,001
Ethen	-0,18	83,94	0,9980	0,001
Pentan	-0,38	56,05	0,9864	0,001

p: Irrtumswahrscheinlichkeit

Die Eichkurven sind in den Abbildungen 1 - 3 graphisch dargestellt.

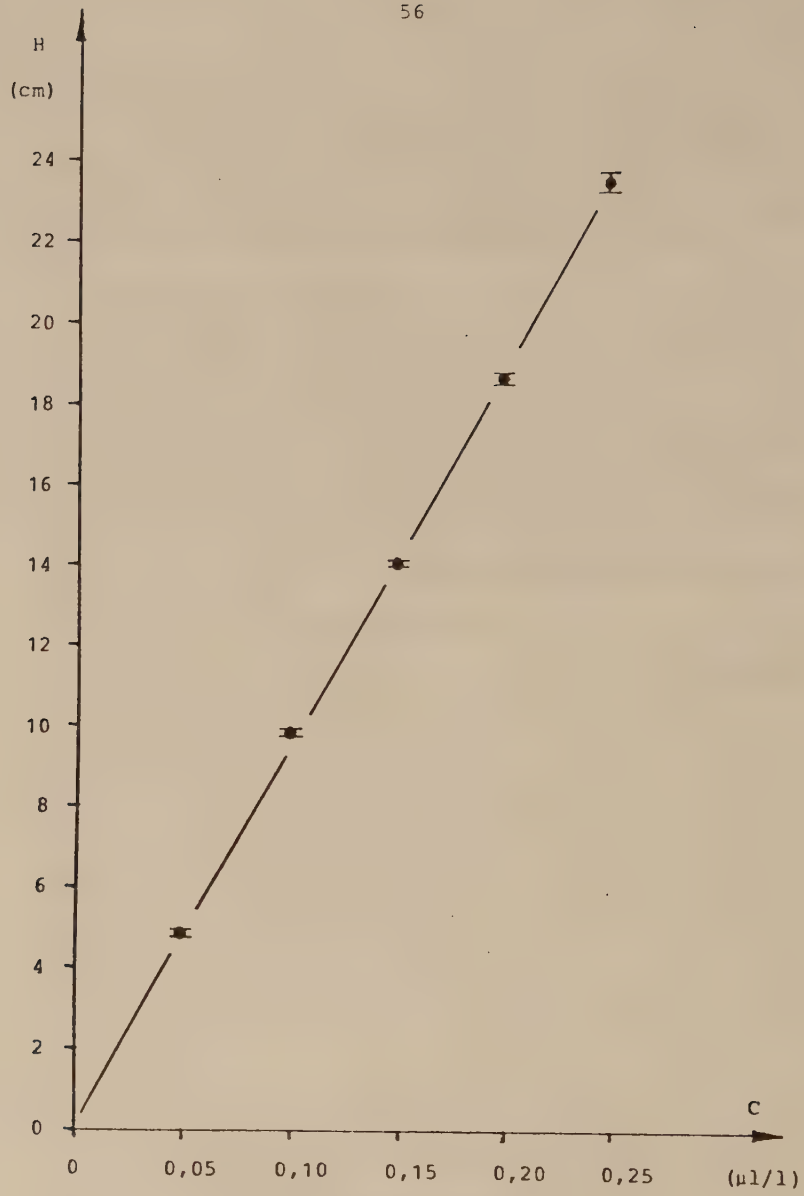


Abb. 1: Eichkurve für Ethan ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

H: Peakhöhe

C: Konzentration

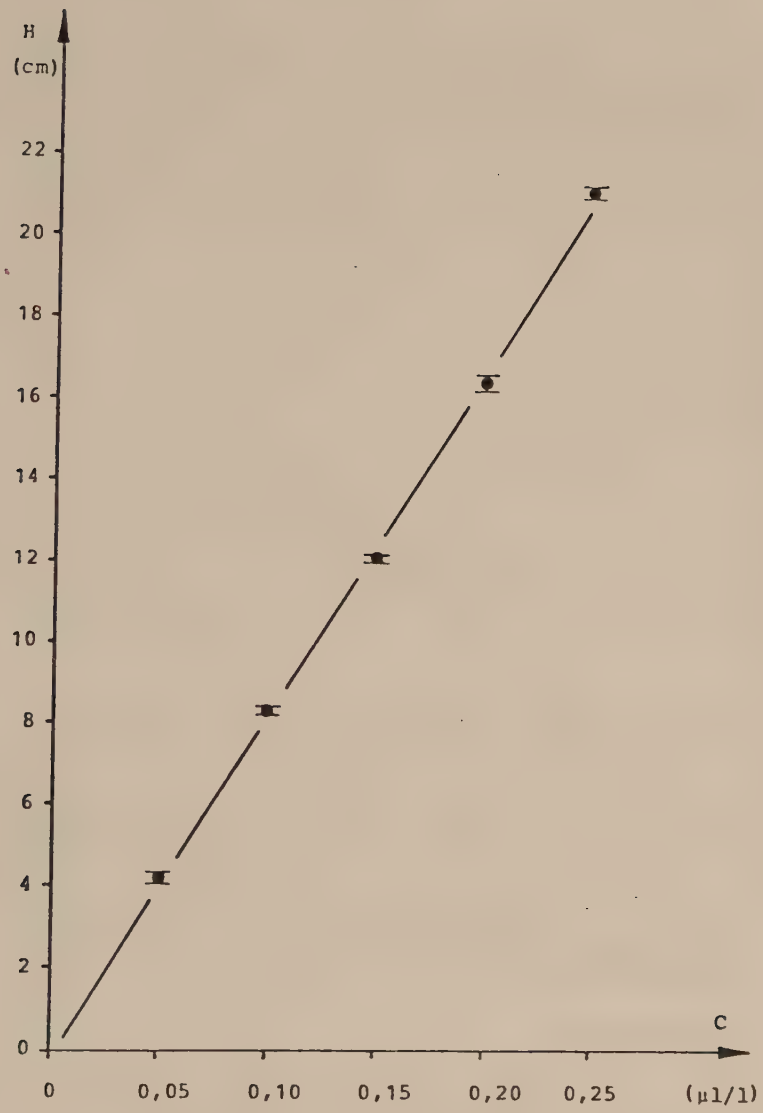


Abb. 2: Eichkurve für Ethen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

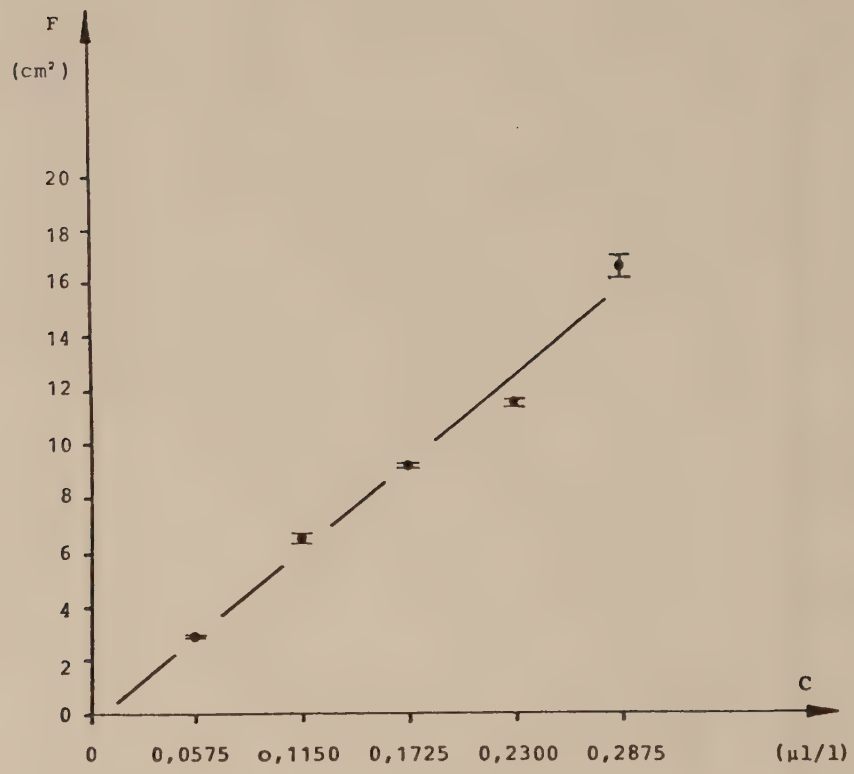


Abb. 3: Eichkurve für Pentan ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

F: Peakfläche

4.2.2 Berechnung der Kohlenwasserstoffexspiration

Aus den unter 3.4 und 4.2.1 angegebenen Größen und dem Zusammenhang zwischen Peakgröße und Gaskonzentration konnte folgende Formel zur Berechnung der im Laufe des Versuches im Exsikkator angesammelten Kohlenwasserstoffmenge entwickelt werden (Schmid, 1983) :

$$M = \frac{44{,}64 \cdot (F - a) \cdot V}{b \cdot G} \quad (\text{nmol/kg} \cdot \text{t})$$

Dabei haben die verwendeten Symbole folgende Bedeutung:

M: Kohlenwasserstoffmenge (nmol/kg·t)
F: Peakgröße (Höhe in cm bzw. Fläche in cm^2)
a,b: Eichkurvenparameter aus Tab. 2
V: Nettovolumen des Exsikkators (ml)
G: Masse der Versuchstiergruppe (g)
t: Versuchsdauer (min)

4.2.3 Eichkurve für Malondialdehyd

Zur Erfassung des in der Leber gebildeten Malondialdehyds wurde wiederum eine Eichkurve erstellt, bei der als Eichsubstanz Malondialdehyd-bis-(diethylacetal) diente und die Extinktion beim Absorptionsmaximum 535 nm gemessen wurde.

Dabei konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der Eichsubstanz und der Extinktion festgestellt werden, der durch die Regressionsgleichung

$$E_{535} = a + bC$$

mit E_{535}: Extinktion bei 535 nm
a,b: pigmentspezifische Regressionskoeffizienten
C: Malondialdehydkonzentration (nmol/5,5 ml)

wiedergegeben wird.

Die aus den erhaltenen Werten berechneten pigmentspezifischen Konstanten, den Korrelationskoeffizienten (r) für den Zusammenhang zwischen Malondialdehyd (MDA)-Konzentration und der Extinktion sowie die statistische Beurteilung gibt Tabelle 3 wieder.

Tab. 3: Eichkurvenparamter für Malondialdehyd

a	b	r	p <
0,11	0,03	0,9969	0,001

Die Eichkurve ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

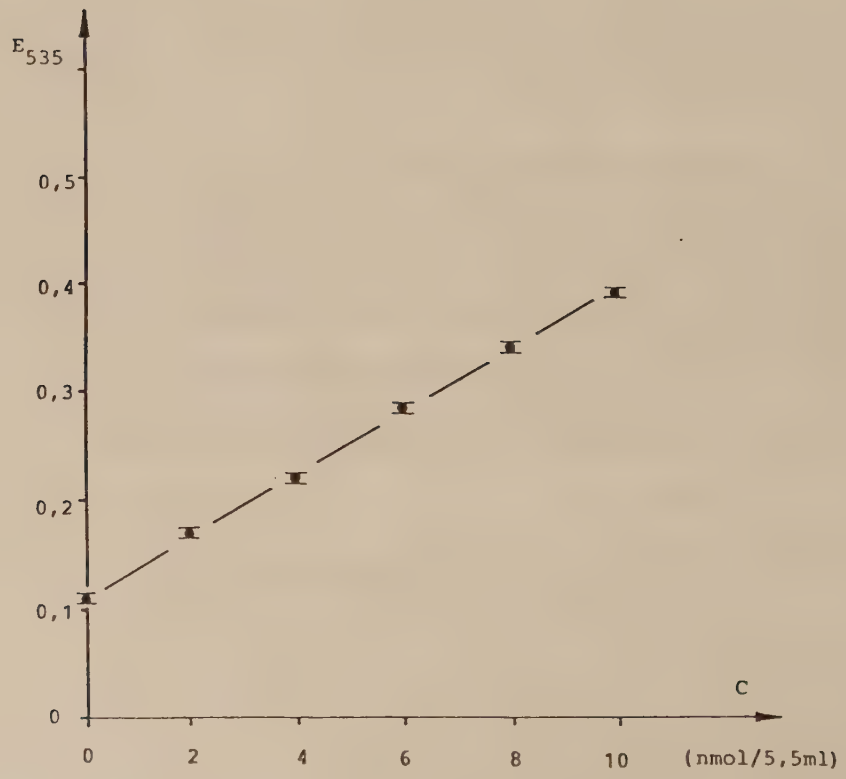


Abb. 4: Eichkurve für Malondialdehyd ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

4.2.4 Berechnung der Malondialdehydkonzentration

Aus den unter 3.5 und 4.2.3 angegebenen Größen und dem Zusammenhang zwischen MDA-Konzentration und Extinktion ist die im Laufe des Versuchs in der Leber gebildete Menge Malondialdehyd nach folgender Formel berechnet worden (Beuter, 1982)

$$M = \frac{4 \cdot (E-a)}{b}$$

(Faktor 4, da im Versuchsansatz 0,25 g Leber enthalten sind)

dabei bedeuten die verwendeten Symbole:

M: Malondialdehydgehalt der Leber (nmol/g)

E: Extinktion bei 535 nm

a,b: Eichkurvenparameter aus Tab. 3

5 Ergebnisse

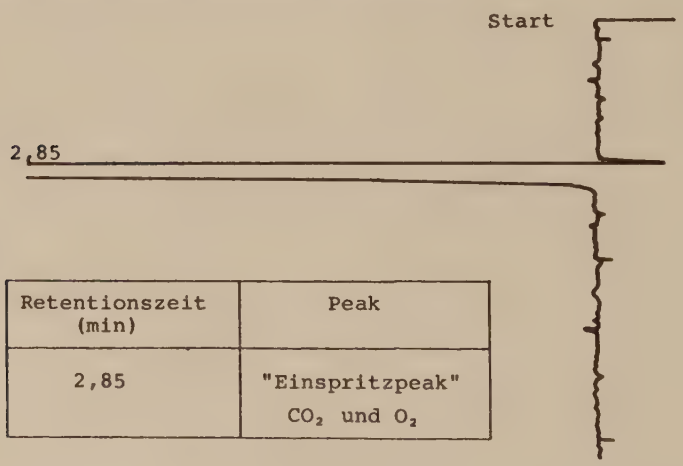
Auf die beschriebene Weise sind folgende Ergebnisse ermittelt worden:

5.1 Vorversuche

5.1.1. Blindversuche mit synthetischer Luft

Zum Ausschluß einer spontanen Kohlenwasserstoffbildung in der Versuchsapparatur sind Blindversuche mit dem versuchsfertigen und mit synthetischer Luft beschickten Exsikkator durchgeführt worden.

Abbildung 6 zeigt das Chromatogramm einer Gasprobe, welche dem Exsikkator 180 Minuten nach Versuchsbeginn entnommen wurde. Dabei ist mit Retentionszeit die zeitliche Dauer zwischen Einspritzung der Gasprobe und der Registrierung des "Einspritzpeaks" bezeichnet.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	"Einspritzpeak" CO_2 und O_2

Abb. 6: Gaschromatogramm eines Blindversuches mit synthetischer Luft

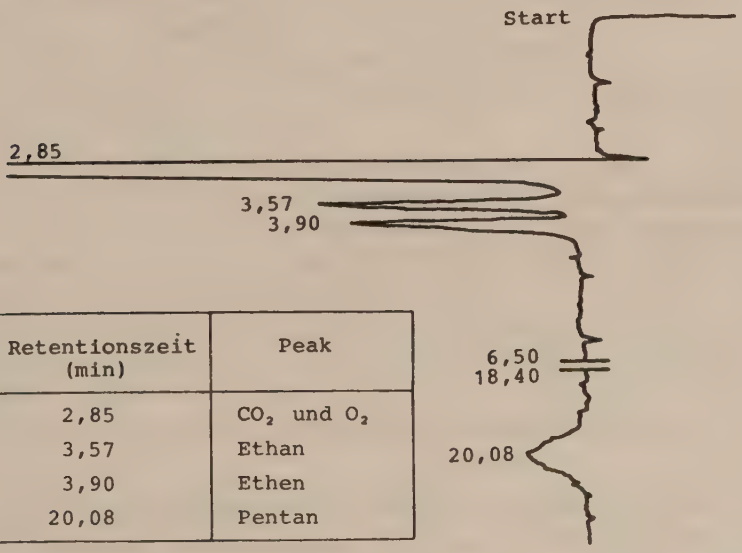
Das vorstehende Chromatogramm ist repräsentativ für alle derartigen Versuche. Es zeigt, daß neben dem unspezifischen Einspritzpeak keine weiteren Peaks auftreten. Dies gilt für eine Retentionszeit bis zu 60 Minuten.

Man kann daraus den Schluß ziehen, daß in der mit synthetischer Luft beschickten Versuchsapparatur im Laufe von 180 Minuten keine spontane Bildung kurzkettiger Kohlenwasserstoffe stattfindet.

5.1.2 Blindversuche mit Referenzgasen

Zur Bestimmung der Retentionszeiten von Ethan, Ethen und Pentan sind Versuche durchgeführt worden, bei welchen diese Kohlenwasserstoffe in den mit synthetischer Luft beschickten Exsikkator eingespritzt wurden, so daß dort eine Endkonzentration von je 0,1 µl Kohlenwasserstoff pro Liter Exsikkatorgas vorlag.

Ein repräsentatives Chromatogramm dieser Versuche ist in Abbildung 7 dargestellt.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen
20,08	Pentan

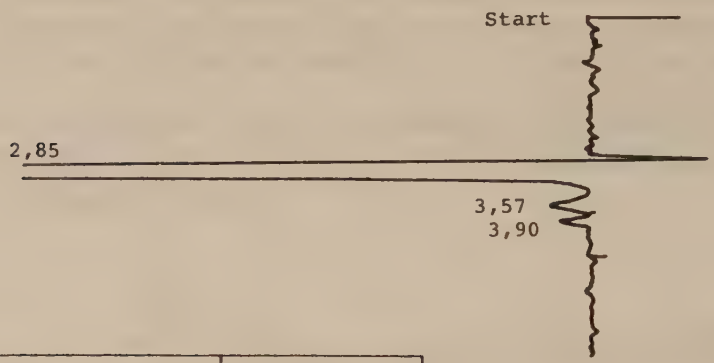
Abb. 7: Gaschromatogramm von Ethan, Ethen und Pentan in synthetischer Luft

Abbildung 7 läßt sich entnehmen, daß die Retentionszeiten für Ethan, Ethen und Pentan 3,57, 3,90 beziehungsweise 20,08 Minuten betragen.

5.1.3 Kontrollversuche mit unbehandelten Versuchstieren

In weiteren Versuchen ist die spontane Kohlenwasserstoffexspiration sowie die Spontanbildung von Malondialdehyd (MDA) in der Leber von nicht vorbehandelten Versuchstieren bestimmt worden.

Abbildung 8 zeigt ein entsprechendes Gaschromatogramm nach 180 Minuten langer Exposition der Versuchstiere im Exsikkator.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen

Abb. 8: Gaschromatogramm unvorbehandelter Versuchstiere

Ein Vergleich von Abbildung 8 mit den Abbildungen 6 und 7 ergibt zunächst, daß auch unvorbehandelte Versuchstiere Ethan und Ethen in nachweisbarer Menge exspirieren.

Uber den Umfang der spontanen Kohlenwasserstoffexspiration und der Malondialdehydbildung in der Leber informiert Tabelle 4.

Tab. 4: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber von unbehandelten Versuchstieren

Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	Pentan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$	$n = 3$
$\bar{x} = 3,8$	$\bar{x} = 3,2$	$\bar{x} = 0,2$	$\bar{x} = 12,7$
$s_{\bar{x}} = 0,5$	$s_{\bar{x}} = 0,3$	$s_{\bar{x}} = 0,2$	$s_{\bar{x}} = 0,8$

n: Stichprobenumfang
$\bar{x}$: arithmetischer Mittelwert
$s_{\bar{x}}$: Standardabweichung von $\bar{x}$
t: Expositionszeit (180 Minuten)

5.2 Testversuche

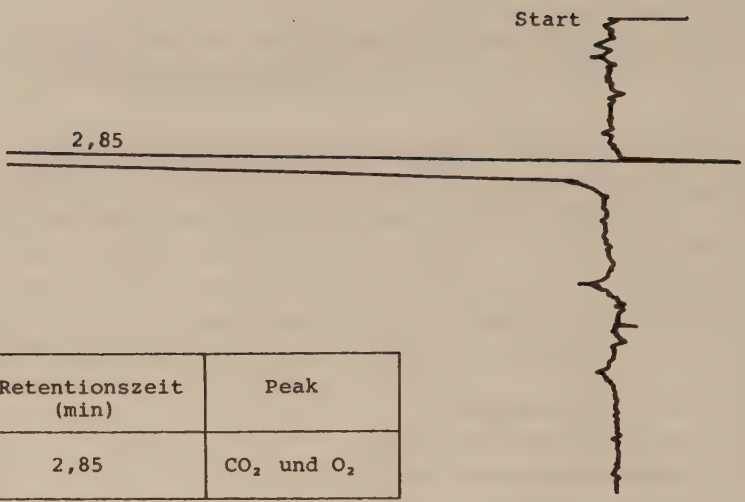
5.2.1 Versuche mit Monobrommethan (Methylbromid)

Im folgenden werden die experimentellen Versuche mit Monobrommethan beschrieben.

5.2.1.1 Blindversuche mit Monobrommethan

Zuerst sind Blindversuche durchgeführt worden, bei welchen 6,5 ml (gasförmiges) Monobrommethan in den versuchsfertigen Exsikkator (mit angefeuchtetem Atemkalk) injiziert und dort 180 Minuten exponiert wurden.

Das typische Chromatogramm einer danach entnommenen Gasprobe ist in Abbildung 9 dargestellt.



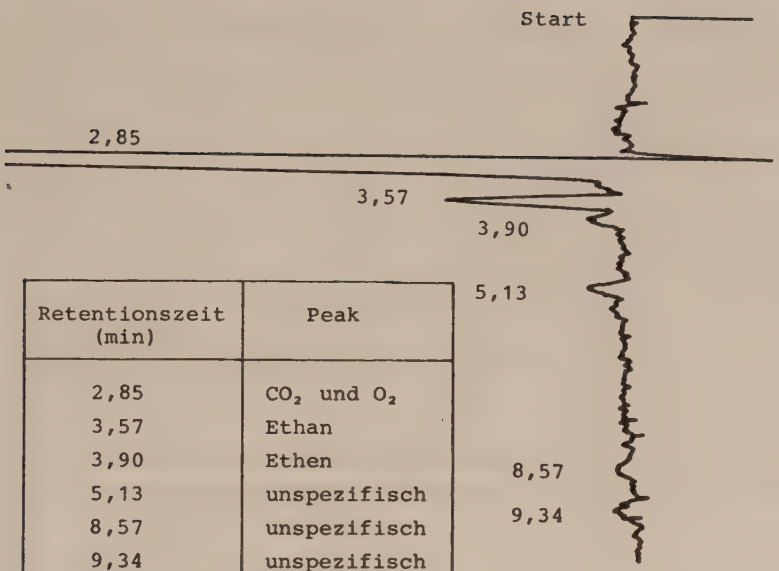
Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2

Abb. 9: Blindversuch mit Monobrommethan in synthetischer Luft

Dem vorstehenden Chromatogramm läßt sich entnehmen, daß in der mit Monobrommethan beschickten Versuchsapparatur im Laufe von 180 Minuten keine gas- oder dampfförmigen Stoffe gebildet werden, welche die analytische Bestimmung von Ethan oder Ethen stören (vgl. Abbildung 7).

5.2.1.2 Testversuche mit Monobrommethan

Die nächste Abbildung zeigt ein typisches Chromatogramm des Exsikkatorgases nach 180 Minuten langer Exposition von Versuchstieren, denen bei Versuchsbeginn 178 mg Monobrommethan pro kg Körpermasse intraperitoneal verabreicht wurden.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen
5,13	unspezifisch
8,57	unspezifisch
9,34	unspezifisch

Abb. 10: Gaschromatogramm von Versuchstieren nach Monobrommethanbelastung

Abbildung 10 zeigt, daß unter den angegebenen Bedingungen Ethan- und Ethenpeaks im Gaschromatogramm nachweisbar sind; darüber hinaus ist ein - in Abbildung 10 nicht dargestellter - Pentanpeak mit einer Retentionszeit von 20,08 Minuten aufgetreten.

Zur Prüfung eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen Kohlenwasserstoffexspiration und Monobrommethanbelastung der Versuchstiere sind die exspirierten Kohlenwasserstoffe quantitativ bestimmt und ihre Dosisabhängigkeiten untersucht worden.

Auf gleiche Weise wurde mit der Malondialdehydbildung in der Leber der Versuchstiere verfahren.

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Untersuchungen gehen aus Tabelle 5 hervor.

Tab. 5: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion der CH_3Br-Dosis

CH_3Br-Dosis (mg/kg)		Kohlenwasserstoffe (nmol/kg·t) Ethan	Ethen	Pentan	MDA (nmol/g·t)
0	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	3,4	2,5	0,2	10,6
	$s_{\bar{x}}$	0,7	0,6	0,1	1,3
109	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	4,2	1,9	0,5	12,7
	$s_{\bar{x}}$	0,7	0,1	0,2	1,6
123	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	3,8	2,0	0,5	14,8
	$s_{\bar{x}}$	0,8	0,2	0,3	3,6
137	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	4,6	2,3	0,5	14,2
	$s_{\bar{x}}$	0,1	0,1	0,3	2,1
150	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	5,5	1,9	1,0	15,8
	$s_{\bar{x}}$	1,0	0,4	0,1	1,3
164	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	8,9	2,7	0,9	16,0
	$s_{\bar{x}}$	0,5	0,6	0,3	3,4
178	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	11,5	2,2	1,2	17,0
	$s_{\bar{x}}$	2,6	0,2	0,3	1,9
192	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	18,4	2,3	1,2	18,3
	$s_{\bar{x}}$	3,9	0,2	0,4	1,6
205	n	3	3	3	3
	$\bar{x}$	43,1	2,7	3,5	18,8
	$s_{\bar{x}}$	2,4	0,4	1,6	2,0

Aus Tabelle 5 ergibt sich, daß die Ethan- und die Pentanexspiration sowie die Malondialdehydbildung in der Leber positiv mit der Monobrommethandosis korreliert sind, während die Ethenexspiration eine Dosisabhängigkeit vermissen läßt (vgl. Tabelle 4). Dies ist in den folgenden Abbildungen 11, 12 und 13 graphisch dargestellt.

In Ergänzung der Dosis-Wirkungs-Untersuchungen ist auch die Zeitabhängigkeit der Ethanakkumulation im Exsikkator der mit Monobrommethan belasteten Versuchstiere bestimmt worden.

Das Ergebnis geht aus Tabelle 6 hervor und ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

Tab. 6: Ethanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Expositionszeit nach 178 mg CH_3Br pro kg Körpermasse

Zeit (min)		0	30	60	90	120	150	180
Ethan	n	3	3	3	3	3	3	3
(nmol/kg·t)	$\bar{x}$	0,0	3,7	8,7	10,2	11,4	11,5	11,7
	$s_{\bar{x}}$	0,0	0,5	1,9	2,4	2,6	2,0	2,0

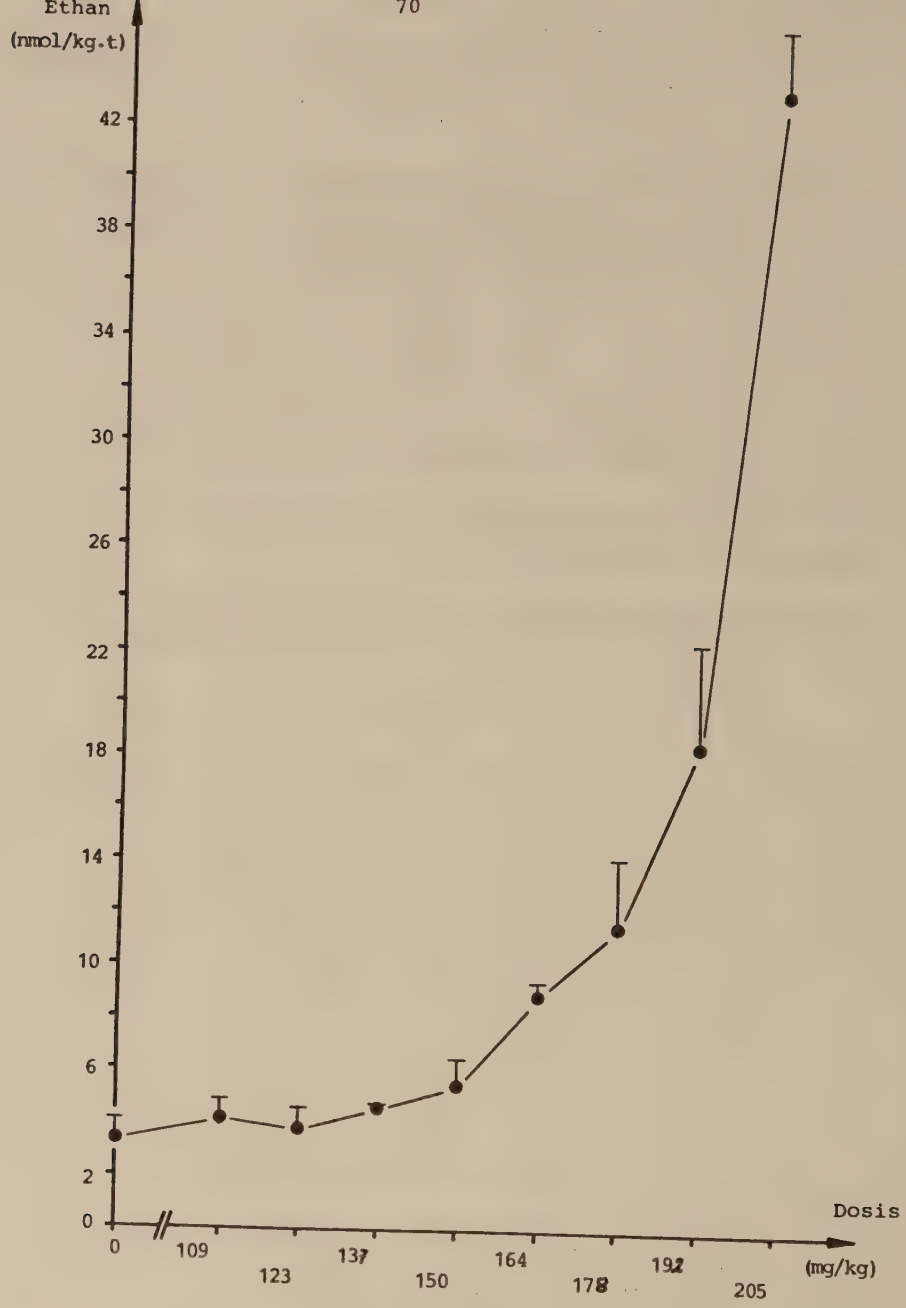


Abb. 11: Ethanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Monobrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

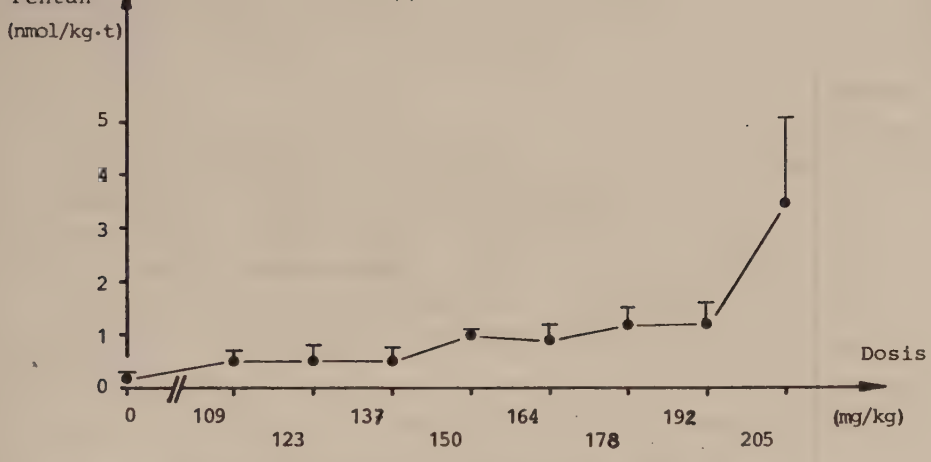


Abb. 12: Pentanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Monobrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

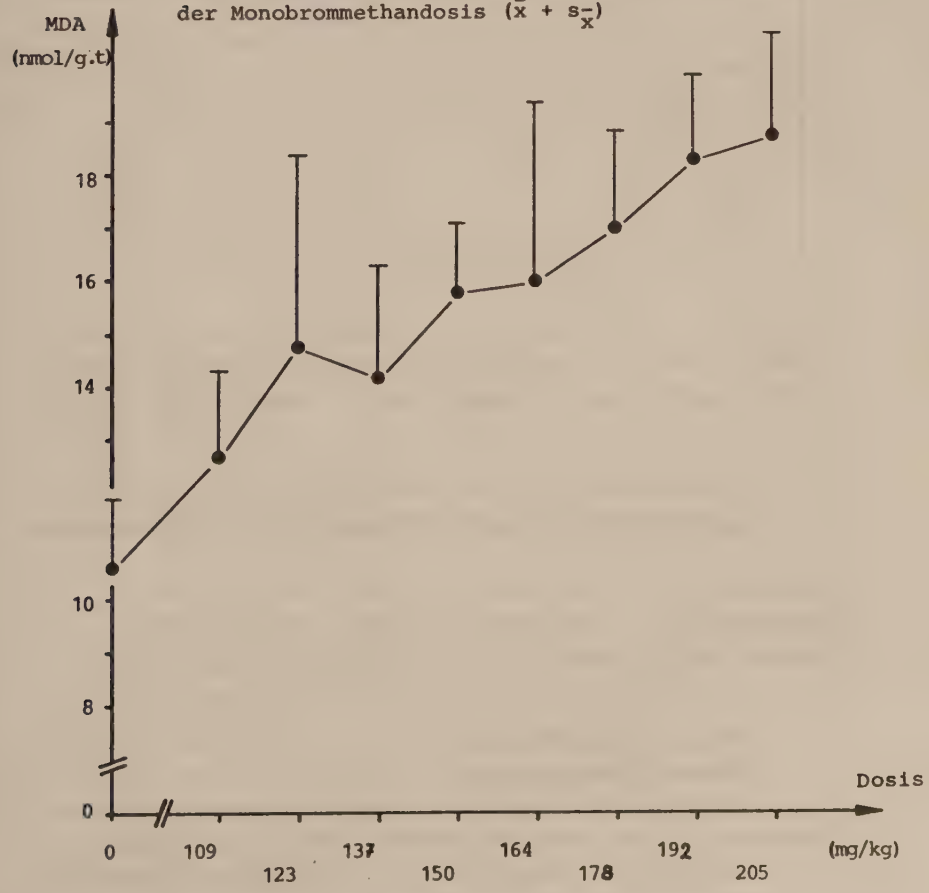


Abb. 13: MDA-Bildung in der Leber als Funktion der Monobrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

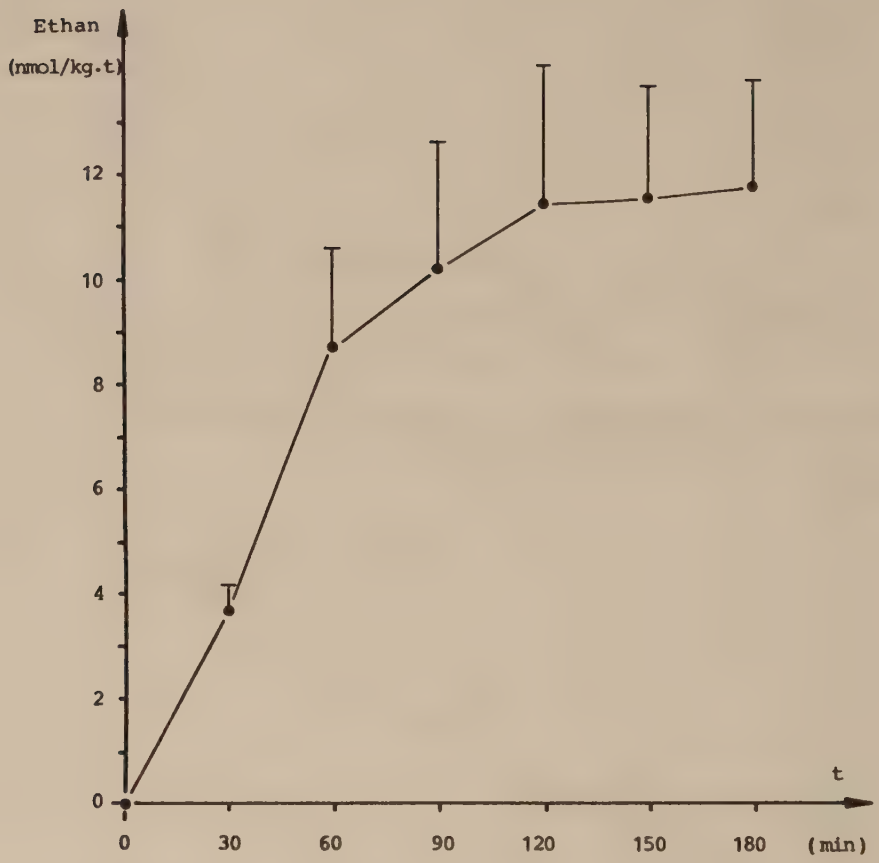


Abb. 14: Ethanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Expositionszeit (t) nach 178 mg CH_3Br pro kg Körpermasse

Aus Tabelle 6 und Abbildung 14 ergibt sich, daß die Ethanakkumulation im Exsikkator der mit Monobrommethan belasteten Versuchstiere zunächst schnell ansteigt und sich nach 2stündiger Expositionszeit nur noch wenig ändert.

5.2.1.3 Abhängigkeit der Monobrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck

Die in Tabelle 5 dokumentierte Dosisabhängigkeit der Ethanexspiration und der Malondialdehydbildung kann auf einer Biotransformation von Monobrommethan zu Radikalen und/oder

einer anders gearteten Radikalbildung beruhen. Um darüber weiteren Aufschluß zu erhalten, ist die Bedeutung des Sauerstoffpartialdruckes (p_{O_2}) im Atemgas der Versuchstiere für die Kohlenwasserstoffexspiration und die Malondialdehydbildung untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 7 bzw. Abbildung 15 und 16 dargestellt.

Tab. 7: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion des p_{O_2} im Atemgas nach 178 mg CH_3Br pro kg Körpermasse.

p_{O_2} (Vol%)		Ethan (nmol(kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
15,0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	18,3	2,8	20,6
	$s_{\bar{x}}$	3,3	0,5	1,0
17,5	n	3	3	3
	$\bar{x}$	13,3	3,0	17,5
	$s_{\bar{x}}$	1,7	0,5	1,4
20,0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	9,1	3,6	17,0
	$s_{\bar{x}}$	0,9	0,5	1,9
22,5	n	3	3	3
	$\bar{x}$	9,3	2,8	17,1
	$s_{\bar{x}}$	1,6	0,5	2,2
25,0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	11,4	2,7	16,7
	$s_{\bar{x}}$	2,8	0,2	1,6
100,0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	8,9	2,9	17,8
	$s_{\bar{x}}$	1,9	0,4	0,1

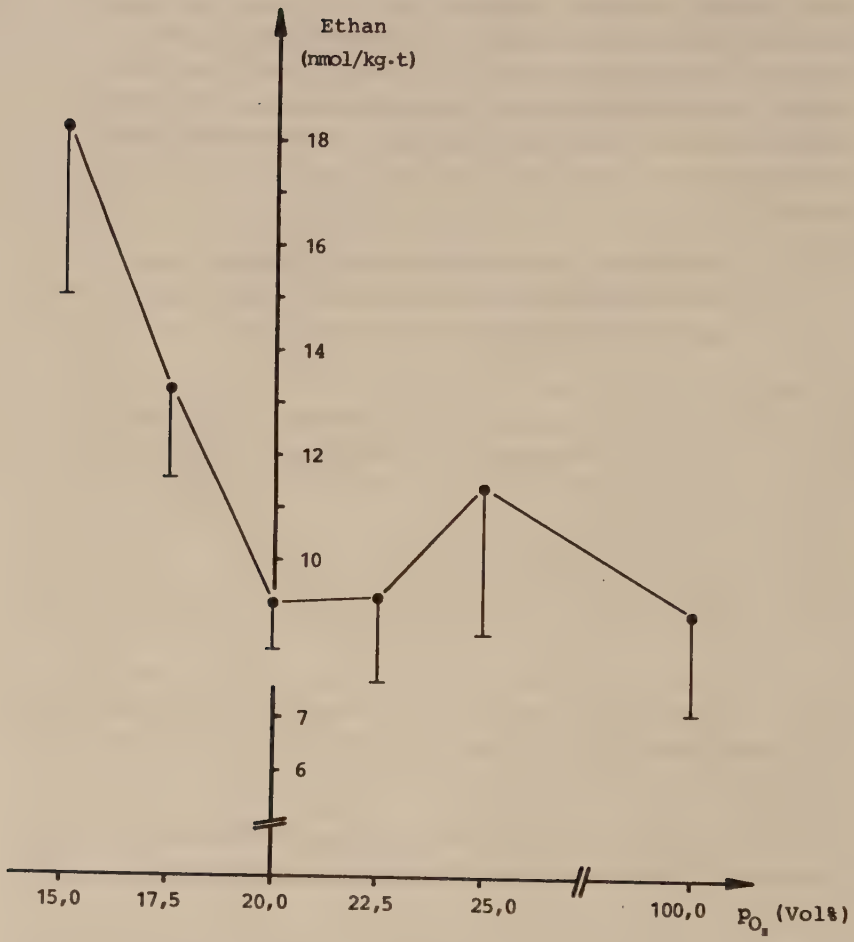


Abb. 15: Ethanexspiration nach Monobrommethan als Funktion des p_{O_2} (s. Tabelle 7)

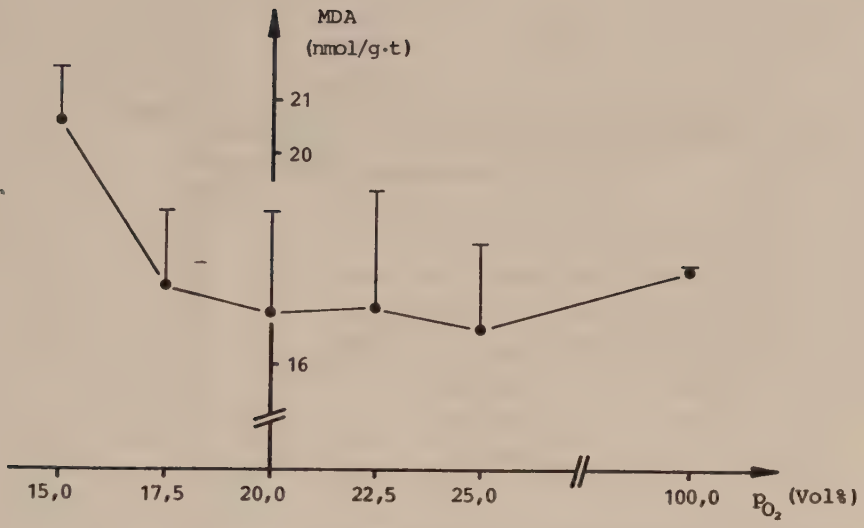


Abb. 16: MDA-Bildung in der Leber nach Monobrommethan als Funktion des p_{O_2} (s. Tabelle 7)

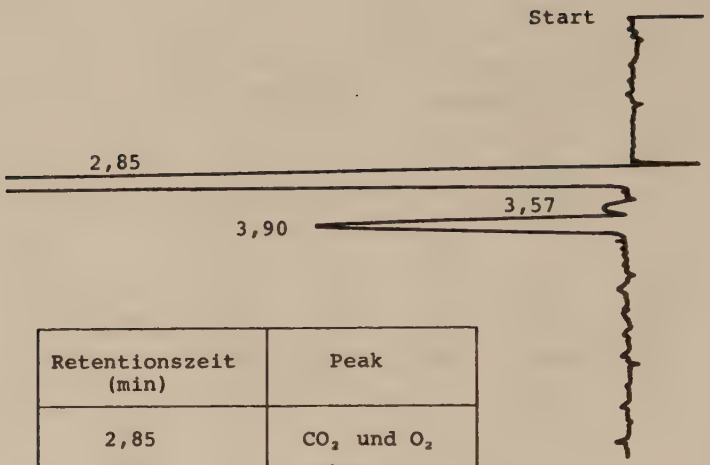
Aus Tabelle 7 sowie den Abbildungen 15 und 16 läßt sich entnehmen, daß die Monobrommethanwirkung (Ethanexspiration und Malondialdehydbildung) bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes unter 20 Vol% ansteigt.

5.2.2 Versuche mit Dibrommethan (Methylenbromid)

5.2.2.1 Blindversuche mit Dibrommethan

Zur Untersuchung einer potentiellen Spontanbildung von Kohlenwasserstoffen durch Reaktion von Dibrommethan mit Atemkalk sind 0,05 ml CH_2Br_2 auf ein Filterpapier im versuchsfertigen, mit synthetischer Luft gefüllten Exsikkator gespritzt und Proben des Exsikkatorgases nach 180 Minuten langer Exposition entnommen worden.

Ein typisches Gaschromatogramm solcher Versuche zeigt Abbildung 17.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen

Abb. 17: Blindversuch mit Dibrommethan in synthetischer Luft

Neben den in Abbildung 17 dargestellten, wurde im Laufe von 60 Minuten ein weiterer, nicht identifizierter Peak mit einer Retentionszeit von 14,27 Minuten registriert.

Das Versuchsergebnis zeigt, daß Dibrommethan im versuchsfertigen Exsikkator spontan zu Ethan, vor allem aber zu Ethen, und einer weiteren flüchtigen Verbindung umgesetzt wird, welche jedoch die Ethanbestimmung nicht stört.

Zur quantitativen Abschätzung der spontanen Kohlenwasserstoffbildung sind verschiedene Dibrommethandosen in Paraffinöl für 120 g Versuchstiere (4 mal 30 g Maus) in den versuchsfertigen Exsikkator injiziert und die Ethan- und Ethenbildung wie aus Tabelle 8 hervorgeht bestimmt worden.

Tab. 8: Ethan- und Ethenbildung aus Dibrommethan in vitro

CH_2Br_2 (mg/kg)		Ethan (nmol/kg·t)	Ethen (nmol/kg·t)
0	n	3	3
	$\bar{x}$	0,0	0,0
	$s_{\bar{x}}$	0,0	0,0
100	n	3	3
	$\bar{x}$	1,3	9,5
	$s_{\bar{x}}$	0,4	5,3
300	n	3	3
	$\bar{x}$	3,0	21,7
	$s_{\bar{x}}$	1,5	9,6
500	n	3	3
	$\bar{x}$	2,1	26,7
	$s_{\bar{x}}$	0,3	8,9
700	n	3	3
	$\bar{x}$	2,0	20,9
	$s_{\bar{x}}$	0,6	6,1
900	n	3	3
	$\bar{x}$	1,9	26,0
	$s_{\bar{x}}$	0,7	10,9
1100	n	3	3
	$\bar{x}$	2,8	28,9
	$s_{\bar{x}}$	1,3	13,5
1300	n	3	3
	$\bar{x}$	4,1	40,3
	$s_{\bar{x}}$	0,9	9,5

t: 180 Minuten

Der vorstehenden Tabelle läßt sich entnehmen, daß die spontane Ethanbildung - im Gegensatz zur Ethenbildung - offensichtlich nicht von der Dibrommethankonzentration im Exsikkator abhängt, sondern bei Dosen von 300 mg/kg (entsprechend 300·120/1000 = 36 mg Dibrommethan) und mehr, weitgehend konstant bleibt.

5.2.2.2 Kontrollversuche mit Paraffinöl

In weiteren Untersuchungen mit Versuchstieren ist die Beeinflussung der Kohlenwasserstoffexspiration und der Malondialdehydbildung in der Leber durch das im folgenden als Lösungsmittel für Di-, Tri- und Tetrabrommethan verwendete paraffinum liquidum geprüft worden. Dazu ist Paraffinöl den Versuchstieren vor deren 180 Minuten langer Exposition im Exsikkator in einer Dosis von 5 ml pro kg Körpermasse - wie bei allen Testversuchen - intraperitoneal verabreicht worden.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber von paraffinbelasteten Versuchstieren

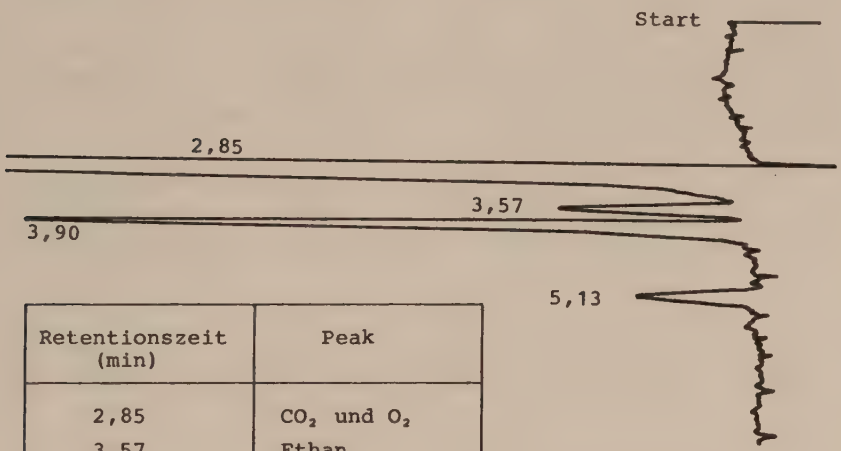
Ethan (nmol/kg·t)	Pentan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
$n = 9$	$n = 9$	$n = 9$
$\bar{x} = 4,1$	$\bar{x} = 0,2$	$\bar{x} = 11,5$
$s_{\bar{x}} = 0,3$	$s_{\bar{x}} = 0,1$	$s_{\bar{x}} = 0,6$

Ein Vergleich von Tabelle 9 mit Tabelle 4 zeigt, daß die Kohlenwasserstoffexspiration der Versuchstiere und die Malondialdehydbildung in der Leber durch eine Paraffinbelastung nicht beeinflußt wird.

5.2.2.3 Testversuche mit Dibrommethan

Nach den vorstehenden Blind- und Kontrollversuchen sind Testuntersuchungen durchgeführt worden, bei welchen Versuchstiere intraperitoneal mit Dibrommethan in Paraffinöl belastet wurden.

Ein typisches Gaschromatogramm dieser Untersuchungen nach der Verabreichung einer CH_2Br_2-Dosis von 900 mg/kg ist in Abbildung 18 dargestellt.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen
5,13	unspezifisch

Abb. 18: Gaschromatogramm von Versuchstieren nach Dibrommethanbelastung

Abgesehen von den aus Abbildung 18 hervorgehenden Kohlenwasserstoffpeaks, ist ein Pentanpeak mit einer Retentionszeit von 20,08 Minuten aufgetreten.

Von den so nachweisbaren drei Kohlenwasserstoffen sind im folgenden nur Ethan und Pentan ausgewertet worden, weil Ethen bereits in vitro aus Dibrommethan entsteht (s. Tabelle 8) und damit als Radikalindikator ungeeignet ist.

Die Ergebnisse einer quantitativen Untersuchung der Ethan- und Pentanexspiration sowie der Malondialdehydbildung in Abhängigkeit von der Dibrommethandosis sind in Tabelle 10 zusammengefaßt und in den Abbildungen 19, 20 und 21 graphisch dargestellt.

Tab. 10: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion der CH_2Br_2-Dosis

CH_2Br_2-Dosis (mg/kg)		Kohlenwasserstoffe (nmol/kg·t) Ethan	Pentan	MDA (nmol/g·t)
0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	4,50	0,26	12,57
	$s_{\bar{x}}$	0,69	0,26	0,74
100	n	3	3	3
	$\bar{x}$	8,5	0,1	11,3
	$s_{\bar{x}}$	0,6	0,1	0,8
300	n	3	3	3
	$\bar{x}$	11,4	1,7	15,4
	$s_{\bar{x}}$	1,1	0,6	3,1
500	n	3	3	3
	$\bar{x}$	13,3	2,9	13,3
	$s_{\bar{x}}$	1,7	0,3	0,5
700	n	3	3	3
	$\bar{x}$	15,2	4,9	14,1
	$s_{\bar{x}}$	0,9	0,5	0,5
900	n	3	3	3
	$\bar{x}$	15,4	3,4	16,7
	$s_{\bar{x}}$	0,6	0,8	2,8
1100	n	3	3	3
	$\bar{x}$	14,6	4,5	18,9
	$s_{\bar{x}}$	2,2	0,9	1,0
1300	n	3	3	3
	$\bar{x}$	10,7	2,8	12,5
	$s_{\bar{x}}$	0,6	0,2	0,3

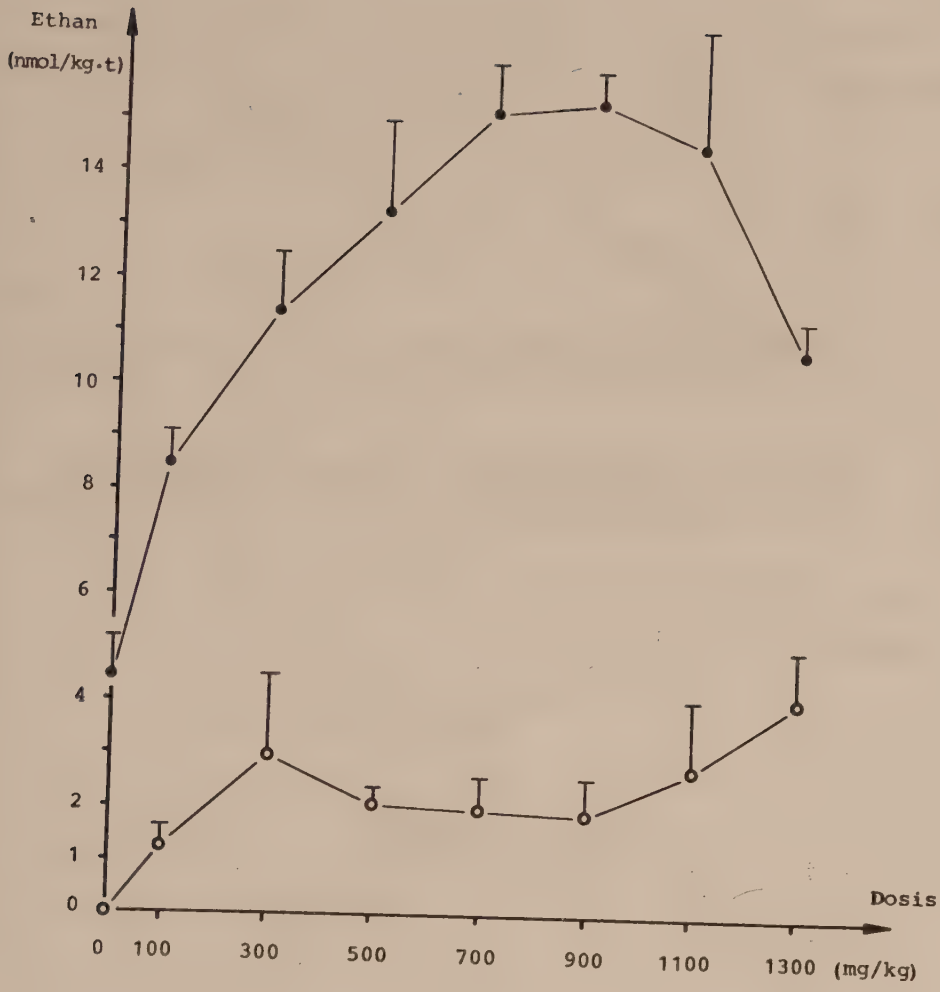


Abb. 19: Ethanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Dibrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$) (•: in vivo, o: in vitro gem. Tabelle 8)

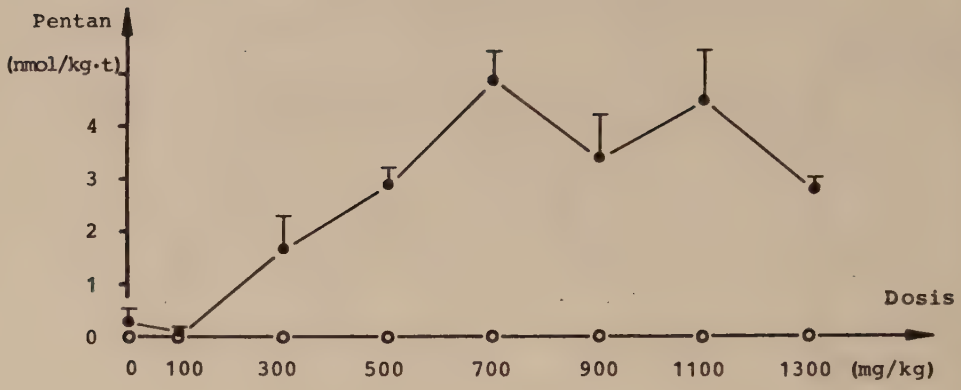


Abb. 20: Pentanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Dibrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$) (●: in vivo, o: in vitro)

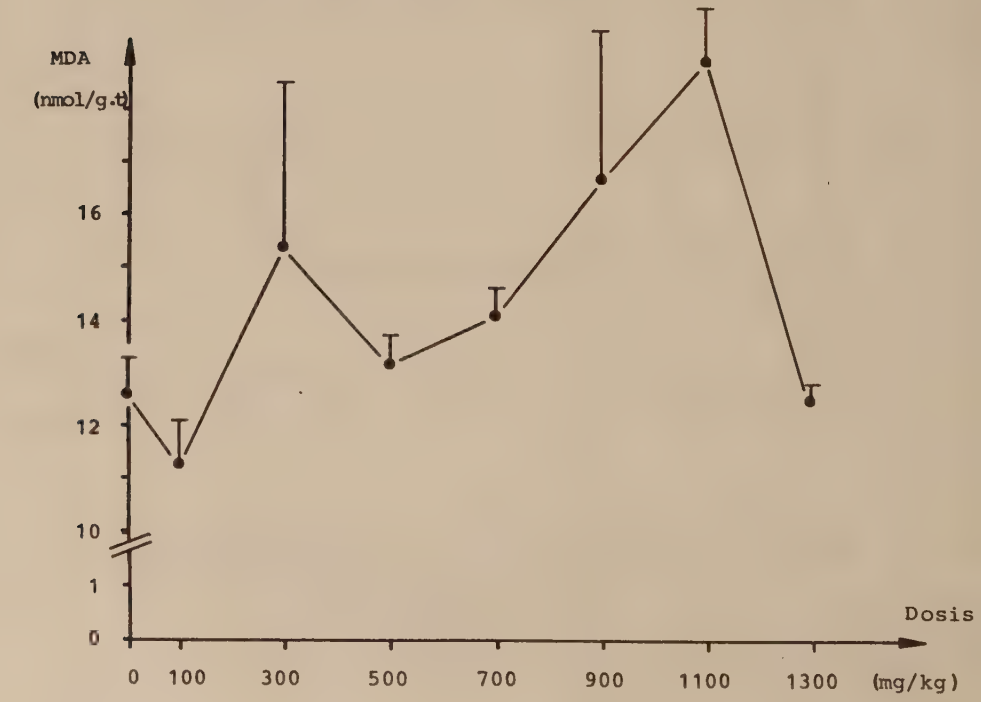


Abb. 21: MDA-Bildung in der Leber als Funktion der Dibrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

Aus Tabelle 10 sowie den Abbildungen 19 bis 21 ergibt sich, daß die Kohlenwasserstoffexspiration (Ethan und Pentan) sowie die Malondialdehydbildung in der Leber bei einer Dibrommethanbelastung der Versuchstiere dosisabhängig gesteigert wird. Die Dosis-Wirkungskorrelation zeigt jedoch im Bereich der höchsten Dosen eine deutliche Abflachung bzw. einen Abfall.

5.2.2.4 Abhängigkeit der Dibrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck

Wie bei Monobrommethan (s. Tabelle 7 sowie Abbildungen 15 und 16), ist auch die Abhängigkeit der Dibrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck in der Atemluft der Versuchstiere untersucht worden.

Dazu sind die Tiere nach intraperitonealer Belastung mit 900 mg Dibrommethan (in 5 ml Paraffinöl) pro kg Körpermasse 3 Stunden lang in Stickstoff mit diversen Sauerstoffpartialdrücken exponiert worden.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt und in den Abbildungen 22 und 23 graphisch dargestellt.

Tab. 11: Ethanexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion des p_{O_2} im Atemgas nach 900 mg CH_2Br_2 pro kg Körpermasse

p_{O_2} (Vol%)		Ethan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
15,0	n	3	3
	$\bar{x}$	12,1	20,0
	$s_{\bar{x}}$	1,1	1,9
17,5	n	3	3
	$\bar{x}$	12,0	18,2
	$s_{\bar{x}}$	1,1	3,2
20,0	n	3	3
	$\bar{x}$	15,4	16,7
	$s_{\bar{x}}$	0,6	2,8

Fortsetzung Tab. 11

P_{O_2} (Vol%)		Ethan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
22,5	n	3	3
	$\bar{x}$	15,0	19,8
	$s_{\bar{x}}$	1,6	1,0
25,0	n	3	3
	$\bar{x}$	12,3	18,6
	$s_{\bar{x}}$	1,1	1,3
100,0	n	3	3
	$\bar{x}$	9,3	10,6
	$s_{\bar{x}}$	1,0	1,1

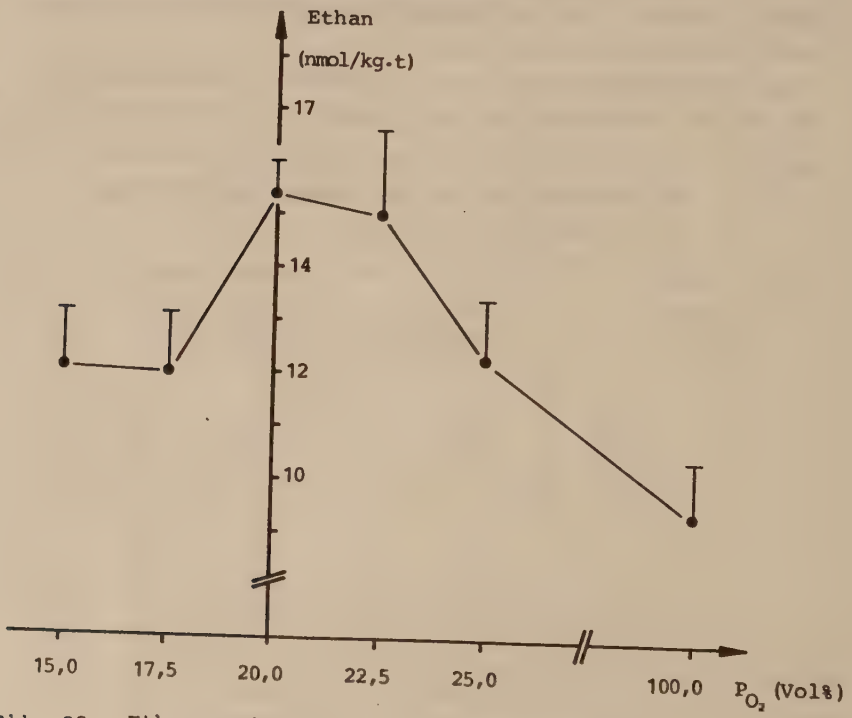


Abb. 22: Ethanexspiration nach Dibrommethan als Funktion des P_{O_2} (s. Tabelle 11)

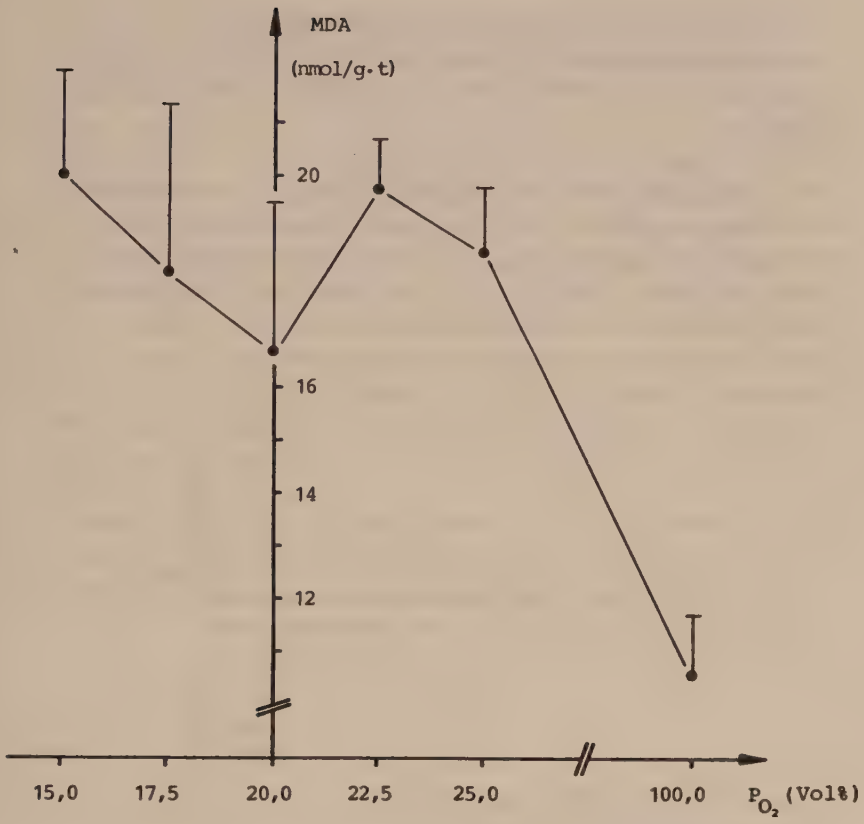


Abb. 23: MDA-Bildung in der Leber nach Dibrommethan als Funktion des P_{O_2} (s. Tabelle 11)

Aus Tabelle 11 sowie den Abbildungen 22 und 23 geht hervor, daß

- die Ethanexspiration bei einer Änderung des normalen Sauerstoffpartialdruckes der Luft (20 Vol%) abnimmt, während
- die Malondialdehydbildung in der Leber bei einer Erniedrigung des (normalen) Sauerstoffpartialdruckes ansteigt und bei reiner Sauerstoffbeatmung abfällt.

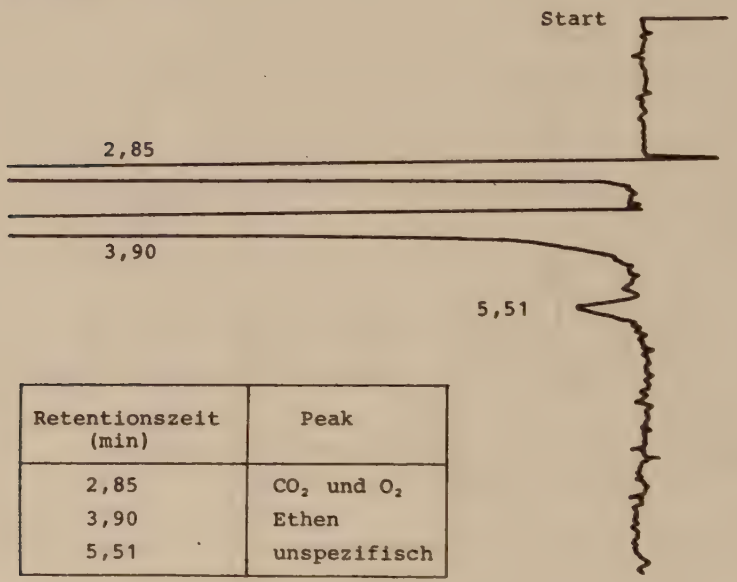
5.2.3 Versuche mit Tribrommethan (Bromoform)

Im folgenden werden die experimentellen Untersuchungen mit Tribrommethan beschrieben, das besser bekannt ist als Bromoform.

5.2.3.1 Blindversuche mit Tribrommethan

Zur Abklärung einer möglicherweise spontan eintretenden Kohlenwasserstoffbildung in der Versuchsapparatur sind 0,05 ml Tribrommethan auf ein Filterpapier im versuchsfertigen Exsikkator gespritzt und Gasproben nach 180 Minuten langer Exposition, wie beschrieben, analysiert worden.

Ein typisches Gaschromatogramm dieser Versuche liegt in Abbildung 24 vor.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,90	Ethen
5,51	unspezifisch

Abb. 24: Blindversuch mit Tribrommethan in synthetischer Luft

Abgesehen von den vorstehend dargestellten Peaks, sind im Laufe von 60 Minuten noch drei weitere Peaks mit Retentionszeiten von 15,22, 19,08 und 23,97 Minuten aufgetreten, die jedoch weder die Bestimmung von Ethan noch jene von Pentan störten.

Insgesamt zeigt der Blindversuch, daß bei der Reaktion von Bromoform mit Atemkalk eine erhebliche Menge Ethen sowie vier weitere flüchtige Verbindungen entstehen, denen als Radikalindikatoren jedoch keine Bedeutung beizumessen ist.

5.2.3.2 Testversuche mit Tribrommethan

Bei den folgenden Untersuchungen sind Versuchstiere intraperitoneal mit verschiedenen Dosen Tribrommethan in Paraffinöl belastet worden.

Ein repräsentatives Chromatogramm nach der Verabreichung von 387 mg CH_3Br pro kg Körpermasse ist in Abbildung 25 dargestellt.

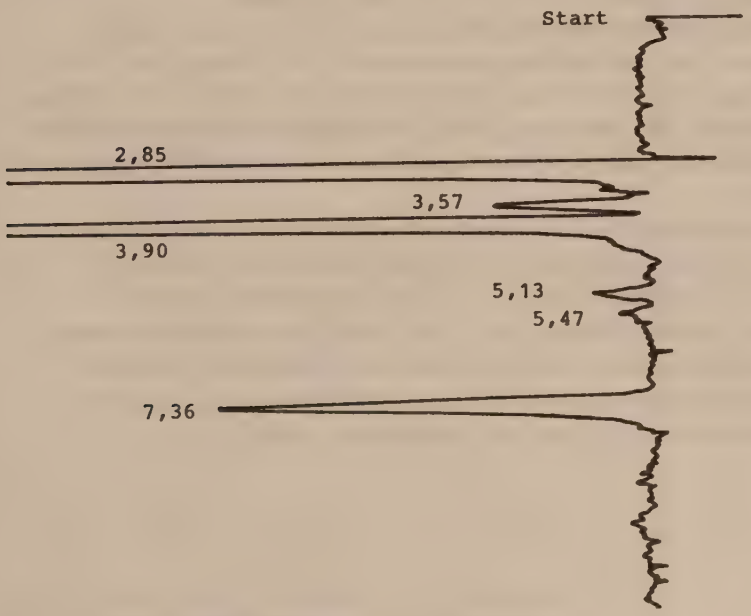


Abb. 25: Gaschromatogramm von Versuchstieren nach Tribrommethanbelastung

Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen
5,13	unspezifisch
5,47	unspezifisch
7,36	unspezifisch

Außer den in Abbildung 25 vorkommenden Peaks hat sich bei diesen Versuchen ein Pentanpeak nach 20,08 Minuten eingestellt.

Damit hat die Belastung der Versuchstiere mit Tribrommethan zum Auftreten

- eines Ethanpeaks nach 3,57 Minuten,
- eines Ethenpeaks nach 3,90 Minuten
- eines Pentanpeaks nach 20,08 Minuten sowie
- dreier weiterer Peaks nach 5,13, 5,47 und 7,36 Minuten

geführt, von welchen die Peaks nach 3,90 (Ethen) und 5,47 Minuten (≡ 5,51 Minuten) auch bei den Blindversuchen beobachtet wurden (s. Abbildung 24), also wahrscheinlich Reaktionsprodukte des exspirierten Bromoforms mit Atemkalk repräsentieren.

Als Indikatoren einer Radikalbildung aus Tribrommethan sind deshalb die Ethan- und Pentanexspiration verwertet worden. Ihre Abhängigkeit von der Tribrommethandosis - ebenso wie die Abhängigkeit der simultan ablaufenden Malondialdehydbildung - wurde in weiteren Versuchen eruiert, deren Ergebnisse in Tabelle 12 zusammengefaßt und in den Abbildungen 26, 27 und 28 dargestellt sind.

Tab. 12: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion der $CHBr_3$-Dosis

$CHBr_3$-Dosis (mg/kg)		Kohlenwasserstoffe (nmol/kg·t) Ethan	Pentan	MDA (nmol/g·t)
0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	3,45	0,20	12,33
	$s_{\bar{x}}$	0,37	0,10	0,55
129	n	3	3	3
	$\bar{x}$	15,1	1,4	20,1
	$s_{\bar{x}}$	1,0	0,6	1,9
258	n	3	3	3
	$\bar{x}$	27,0	7,8	20,8
	$s_{\bar{x}}$	2,0	0,7	3,1
387	n	3	3	3
	$\bar{x}$	25,6	10,3	19,6
	$s_{\bar{x}}$	0,9	0,6	0,5
515	n	3	3	3
	$\bar{x}$	27,4	9,1	20,7
	$s_{\bar{x}}$	1,9	0,6	2,5
644	n	3	3	3
	$\bar{x}$	24,5	8,8	18,3
	$s_{\bar{x}}$	1,2	0,9	1,1
723	n	3	3	3
	$\bar{x}$	19,4	9,9	20,2
	$s_{\bar{x}}$	1,2	0,9	0,4
902	n	3	3	3
	$\bar{x}$	25,6	9,6	15,1
	$s_{\bar{x}}$	3,5	1,0	0,3
1031	n	3	3	3
	$\bar{x}$	34,1	13,5	11,1
	$s_{\bar{x}}$	3,4	1,5	1,3

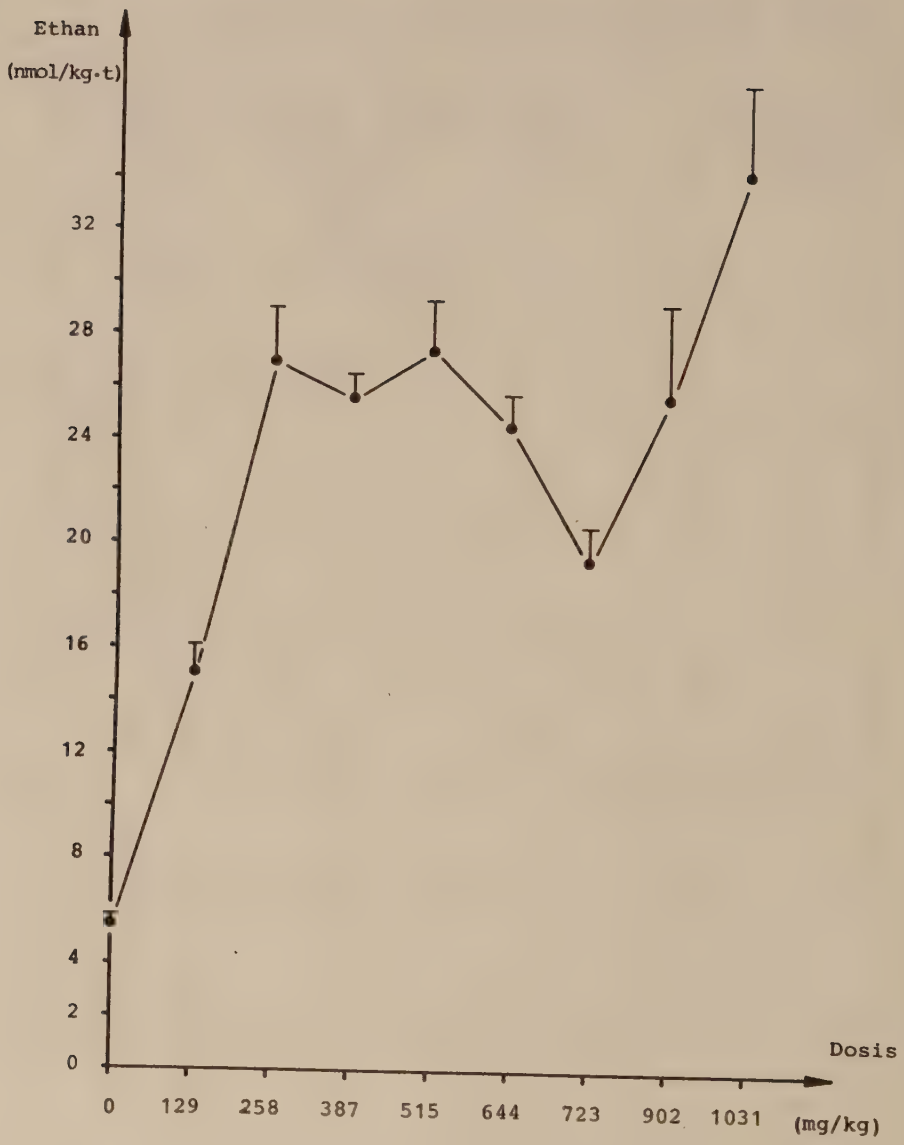


Abb. 26: Ethanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Tribrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

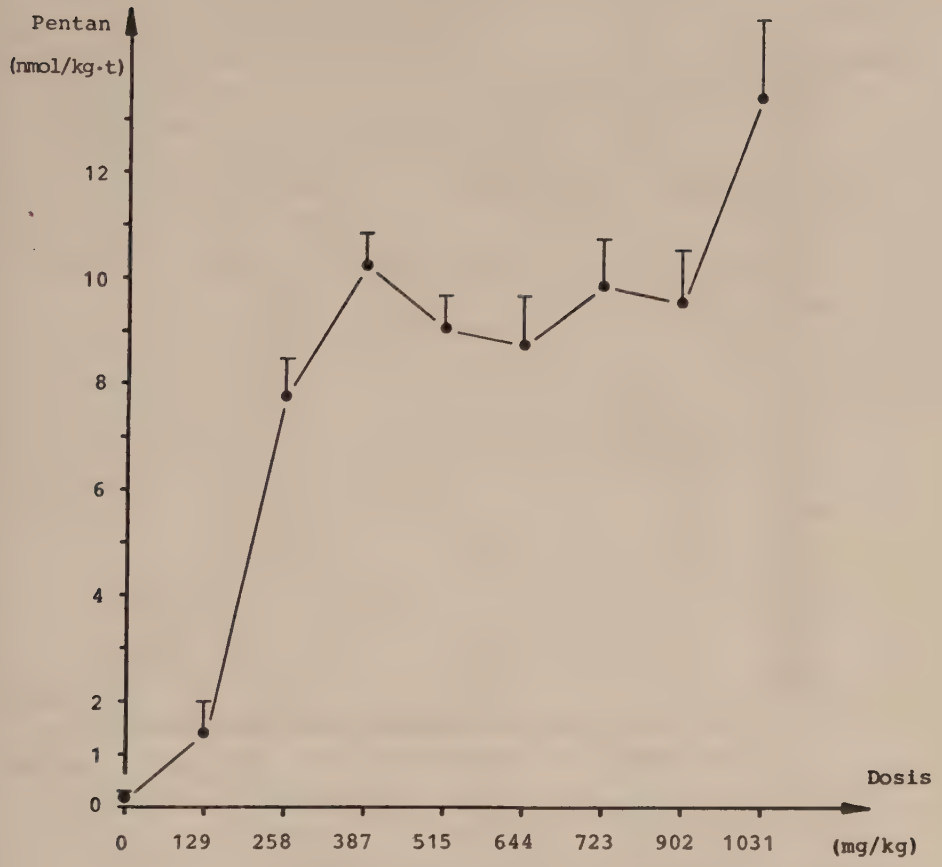


Abb. 27: Pentanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Tribrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

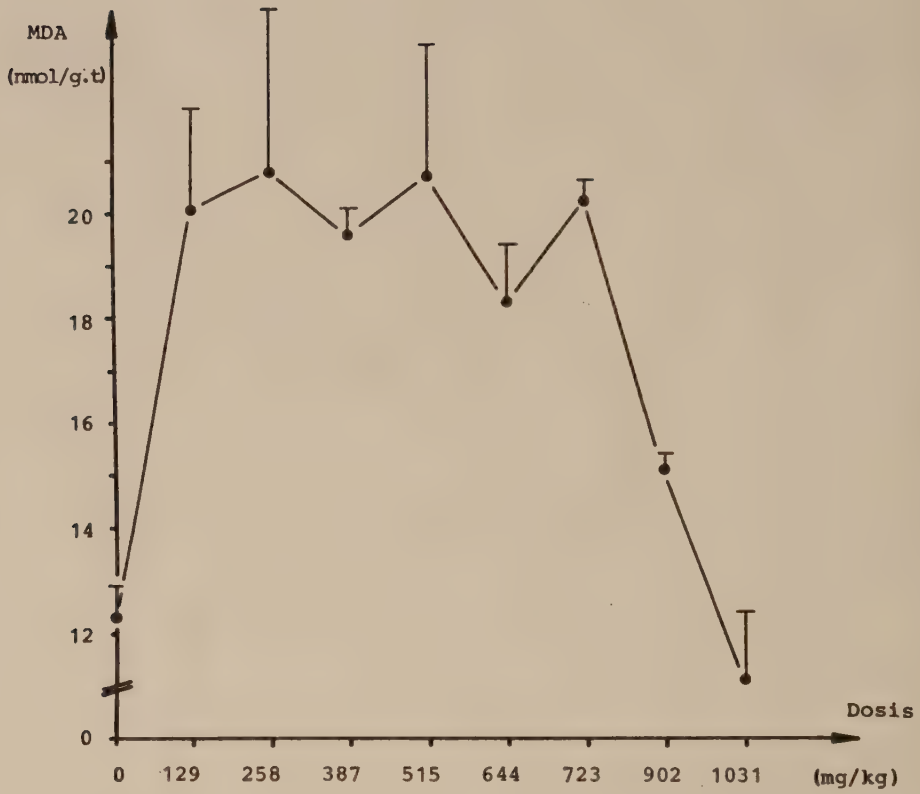


Abb. 28: MDA-Bildung in der Leber als Funktion der Tribrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

Aus Tabelle 12 sowie den Abbildungen 26, 27 und 28 geht hervor, daß die Ethan- und Pentanexspiration durch eine Bromoformbelastung der Versuchstiere stark gesteigert wird, wobei eine erkennbare Dosisabhängigkeit nur im Bereich der niedrigsten und höchsten Dosen vorliegt. Die Malondialdehydbildung in der Leber zeigt ein ähnliches Verhalten mit dem Unterschied, daß sie durch die höchsten Tribrommethandosen praktisch zum Erliegen kommt.

5.2.3.3 Abhängigkeit der Tribrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck

Wie bei Mono- und Dibrommethan, ist auch bei Bromoform die Abhängigkeit der Ethanexspiration und der Malondialdehydbildung in der Leber vom Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere untersucht worden.

Die Ergebnisse können aus Tabelle 13 sowie Abbildung 29 und 30 entnommen werden.

Tab. 13: Ethanexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion des p_{O_2} im Atemgas nach 515 mg $CHBr_3$ pro kg Körpermasse

p_{O_2} (Vol%)		Ethan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
15,0	n	3	3
	$\bar{x}$	24,7	12,1
	$s_{\bar{x}}$	1,8	0,6
17,5	n	3	3
	$\bar{x}$	27,3	15,6
	$s_{\bar{x}}$	1,4	1,4
20,0	n	3	3
	$\bar{x}$	26,4	13,8
	$s_{\bar{x}}$	2,3	1,8
22,5	n	3	3
	$\bar{x}$	27,3	14,2
	$s_{\bar{x}}$	2,2	1,1
25,0	n	3	3
	$\bar{x}$	26,2	13,9
	$s_{\bar{x}}$	1,2	0,8
100,0	n	3	3
	$\bar{x}$	14,7	15,5
	$s_{\bar{x}}$	2,5	1,7

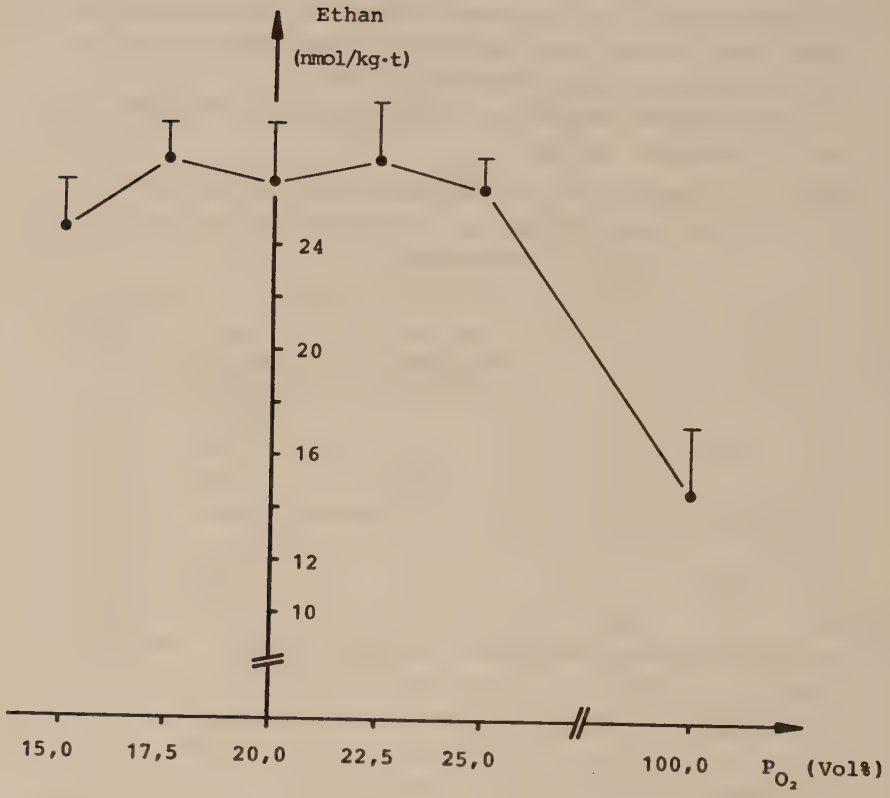


Abb. 29: Ethanexspiration nach Tribrommethan als Funktion des P_{O_2} (s. Tabelle 13)

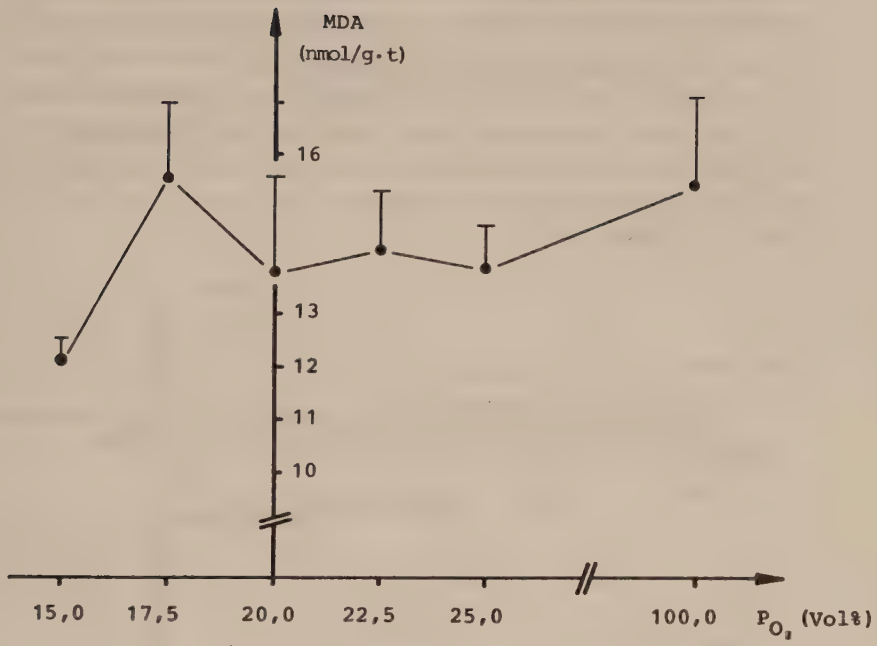


Abb. 30: MDA-Bildung in der Leber nach Tribrommethan als Funktion des p_{O_2} (s. Tabelle 13)

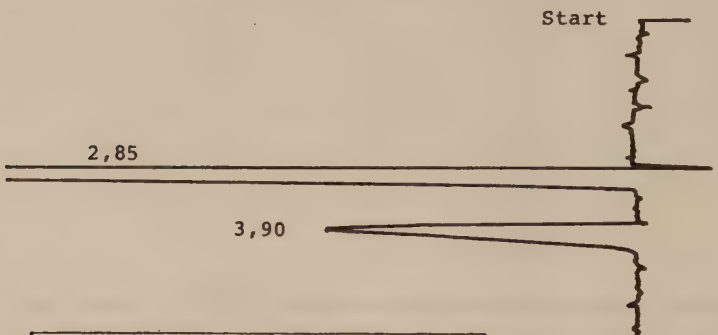
Aus Tabelle 13 sowie Abbildung 29 und 30 geht hervor, daß die Ethanexspiration nach Tribrommethan mit einer Erniedrigung und einer Erhöhung des p_{O_2} abfällt, während dies für die Malondialdehydbildung in der Leber nur bei einer Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes zutrifft.

5.2.4 Versuche mit Tetrabrommethan (Tetrabromkohlenstoff)

Neben den beschriebenen Untersuchungen mit mono-, di- und tribromierten Methanderivaten, sind schließlich analoge Versuche mit Tetrabrommethan angestellt worden.

5.2.4.1 Blindversuche mit Tetrabrommethan

Zur Durchführung der Blindversuche in vitro wurden 26 mg CBr_4 in 0,6 ml Paraffinöl gelöst und auf ein Filterpapier im versuchsfertigen Exsikkator verbracht. Das Chromatogramm einer 180 Minuten später entnommenen Gasprobe ist in Abbildung 31 dargestellt.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,90	Ethen

Abb. 31: Blindversuch mit Tetrabrommethan in synthetischer Luft

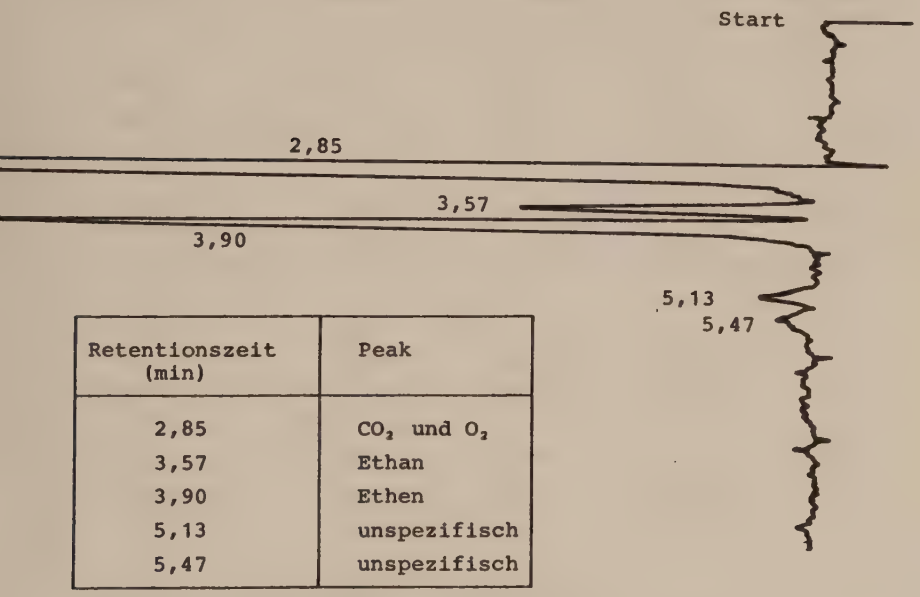
Weitere Peaks sind im Laufe von 60 Minuten nicht aufgetreten.

Der Versuch zeigt, daß Tetrabrommethan offenbar mit dem in der Versuchsapparatur befindlichen Atemkalk reagiert und dabei zu Ethen umgesetzt wird. Damit scheidet dieser Kohlenwasserstoff als Indikator einer metabolischen Radikalbildung bei weiteren Versuchen mit Tetrabrommethan aus.

5.2.4.2 Testversuche mit Tetrabrommethan

Zur Durchführung der Testversuche mit Tetrabrommethan wurde dieses Paraffinöl gelöst und den Versuchstieren intraperitoneal appliziert.

Ein repräsentatives Chromatogramm der Versuche nach einer Verabreichung von 135 mg CBr_4 pro kg Körpermasse ist in Abbildung 32 dargestellt.



Retentionszeit (min)	Peak
2,85	CO_2 und O_2
3,57	Ethan
3,90	Ethen
5,13	unspezifisch
5,47	unspezifisch

Abb. 32: Gaschromatogramm von Versuchstieren nach Tetrabrommethanbelastung

Über sie aus Abbildung 32 ersichtlichen Peaks hinaus, ist bei diesen Versuchen auch ein Pentanpeak nach 20,08 Minuten aufgetreten.

Dies zeigt, daß die Versuchstierbelastung mit Tetrabrommethan eine Exspiration von Ethan sowie 2 weiteren flüchtigen Verbindungen mit Retentionszeiten von 5,13 und 5,47 Minuten induziert.

Die Ergebnisse einer Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Ethan- und Pentanexspiration und der simultan stattfindenden Malondialdehydbildung in der Leber sind in Tabelle 14 zusammengefaßt und in den Abbildungen 33, 34 und 35 dargestellt.

Tab. 14: Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber als Funktion der CBr_4-Dosis

CBr_4-Dosis (mg/kg)		Kohlenwasserstoffe (nmol/kg·t) Ethan	Pentan	MDA (nmol/g·t)
0	n	3	3	3
	$\bar{x}$	4,35	0,18	9,72
	$s_{\bar{x}}$	0,16	0,18	0,48
54	n	3	3	3
	$\bar{x}$	5,8	0,0	16,2
	$s_{\bar{x}}$	0,7	0,0	1,4
81	n	3	3	3
	$\bar{x}$	7,4	0,6	15,5
	$s_{\bar{x}}$	1,0	0,4	1,3
108	n	3	3	3
	$\bar{x}$	9,6	0,8	18,1
	$s_{\bar{x}}$	1,4	0,2	0,4
135	n	3	3	3
	$\bar{x}$	13,2	0,6	16,7
	$s_{\bar{x}}$	1,7	0,1	2,8
162	n	3	3	3
	$\bar{x}$	15,1	0,4	14,4
	$s_{\bar{x}}$	1,6	0,2	2,2
189	n	3	3	3
	$\bar{x}$	23,4	1,5	13,7
	$s_{\bar{x}}$	2,5	0,1	0,4
216	n	3	3	3
	$\bar{x}$	26,2	2,2	17,8
	$s_{\bar{x}}$	5,3	0,8	0,8

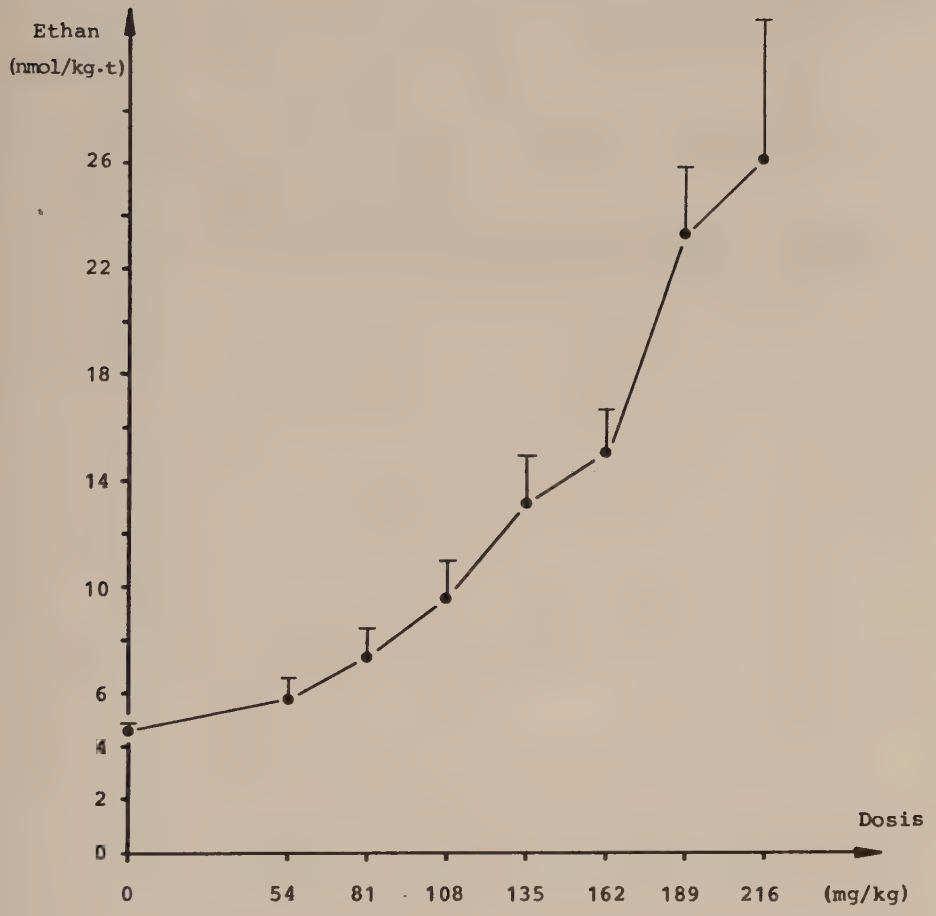


Abb. 33: Ethanakkummulation im Exsikkator als Funktion der Tetrabrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

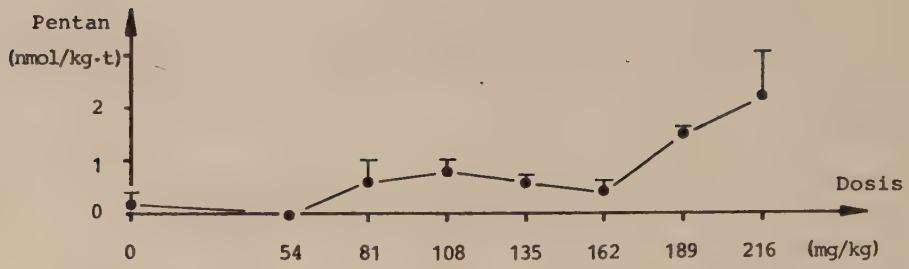


Abb. 34: Pentanakkumulation im Exsikkator als Funktion der Tetrabrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

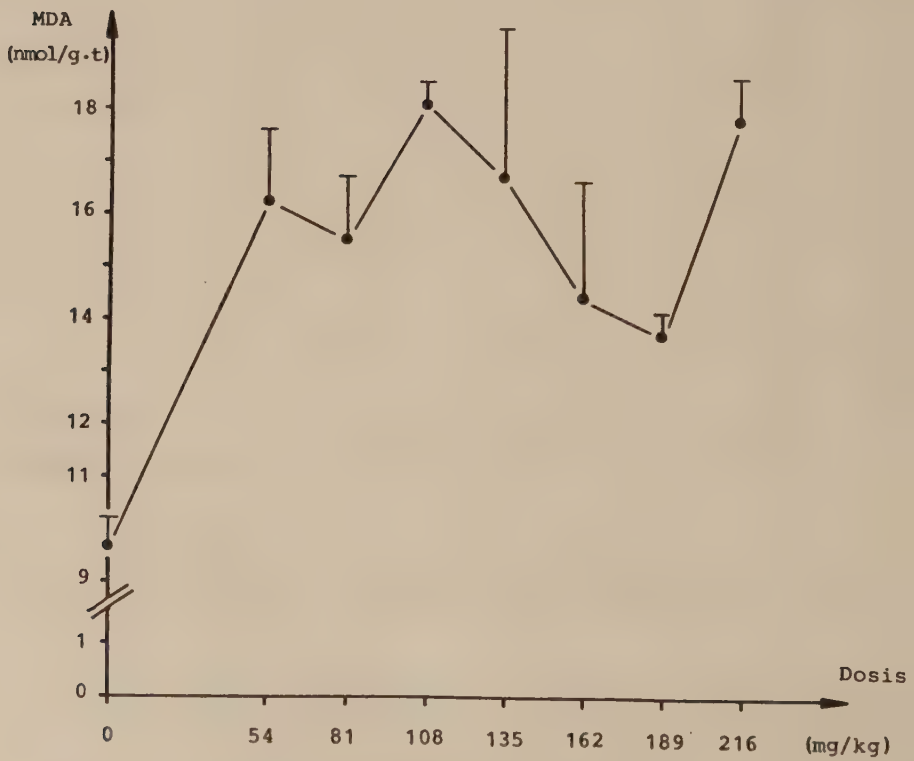


Abb. 35: MDA-Bildung in der Leber als Funktion der Tetrabrommethandosis ($\bar{x} + s_{\bar{x}}$)

Aus Tabelle 14 und den zugehörigen 3 Abbildungen ergibt sich, daß insbesondere die Ethanexspiration positiv mit der Tetrabrommethandosis korreliert ist, während die Malondialdehydbildung in der Leber zwar erhöht ist, jedoch einen mehrgipfeligen unorthodoxen Verlauf aufweist.

5.2.4.3 Abhängigkeit der Tetrabrommethanwirkung vom Sauerstoffpartialdruck

Zur weiteren Abklärung der von Tetrabrommethan induzierten Ethanexspiration und Malondialdehydbildung ist deren Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck in der Atemluft der Versuchstiere mit folgendem Ergebnis getestet worden:

Tab. 15: Ethanexspiration und MDA-Bildungin der Leber als Funktion des p_{O_2} im Atemgas nach 135 mg CBr_4 pro kg Körpermasse

p_{O_2} (Vol%)		Ethan (nmol/kg·t)	MDA (nmol/g·t)
15,0	n	3	3
	$\bar{x}$	28,0	13,1
	$s_{\bar{x}}$	5,6	1,4
17,5	n	3	3
	$\bar{x}$	13,8	16,4
	$s_{\bar{x}}$	2,8	1,1
20,0	n	3	3
	$\bar{x}$	13,2	16,7
	$s_{\bar{x}}$	1,7	2,8
22,5	n	3	3
	$\bar{x}$	12,5	13,9
	$s_{\bar{x}}$	2,7	2,9
25,0	n	3	3
	$\bar{x}$	15,9	11,7
	$s_{\bar{x}}$	2,3	1,2
100,0	n	3	3
	$\bar{x}$	15,3	14,5
	$s_{\bar{x}}$	6,7	1,1

Die vorstehend zusammengefaßten Befunde sind in den Abbildungen 36 und 37 veranschaulicht.

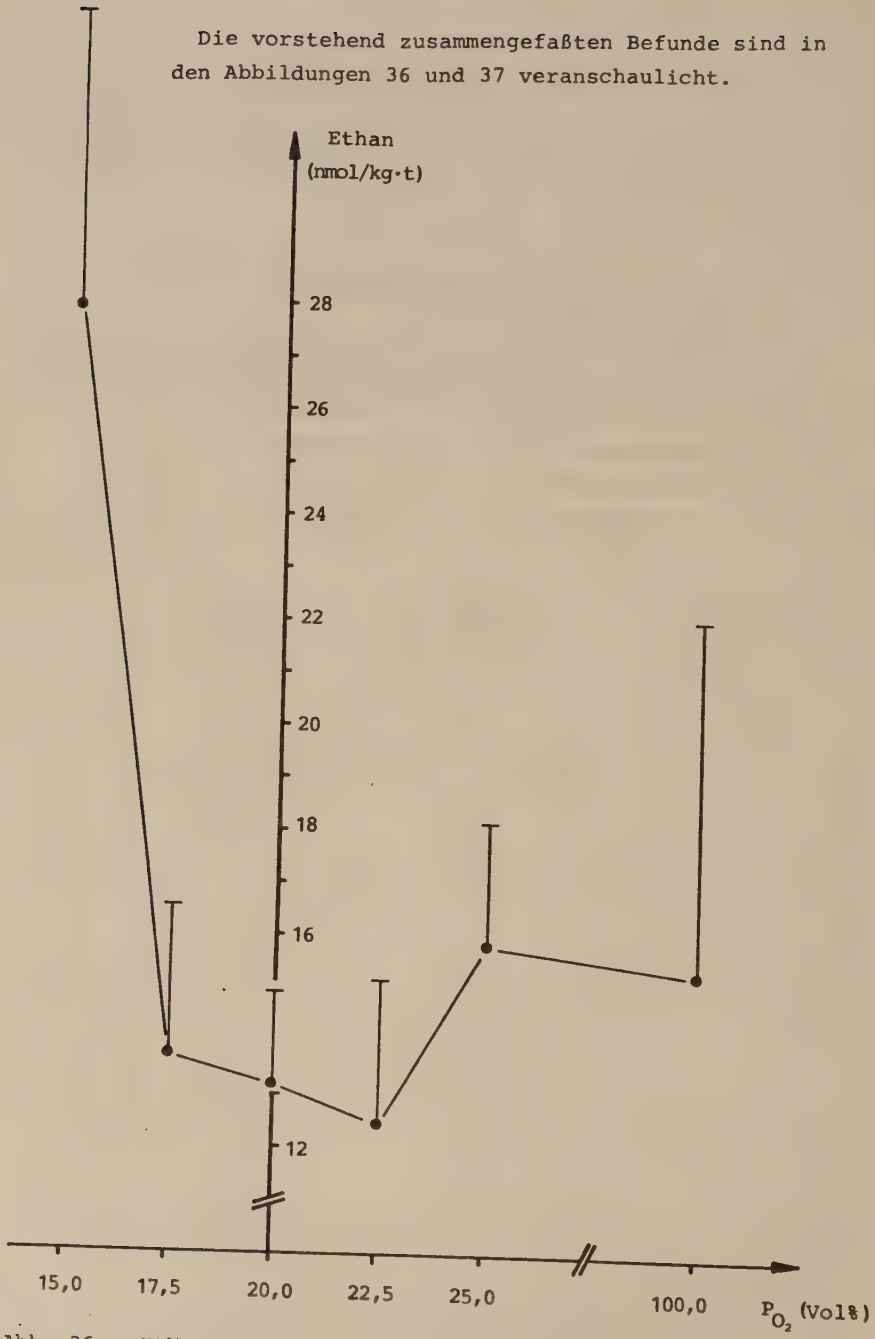


Abb. 36: Ethanexspiration nach Tetrabrommethan als Funktion des P_{O_2} (s. Tabelle 15)

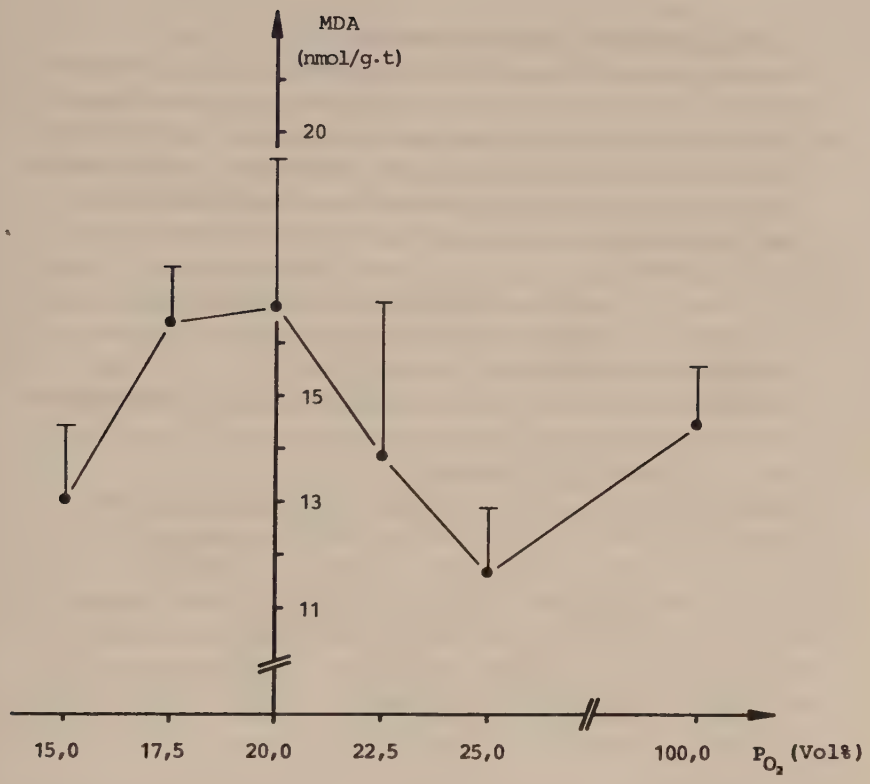


Abb. 37: MDA-Bildung in der Leber nach Tetrabrommethan als Funktion des p_{O_2} (s. Tabelle 15)

Aus Tabelle 15 sowie den Abbildungen 36 und 37 geht hervor, daß die Ethanexspiration bei einer Erniedrigung und einer Erhöhung des normalen Sauerstoffpartialdruckes der Luft (20 Vol%) ansteigt, während die Malondialdehydbildung unter diesen Umständen abfällt.

5.3 Auswertung der Versuchsergebnisse

Die oben dargestellten Ergebnisse der Testversuche (Abschnitt 5.2) sind unter drei Gesichtspunkten auszuwerten:

a) Verursacht eine Belastung der Versuchstiere mit den bromierten Methanderivaten eine statistisch signifikante Zunahme der als Radikalindikatoren zu wertenden Ethan- und Pentanexspiration sowie der Malondialdehydbildung in der Leber?

b) Ist eine ggf. vorliegende gesteigerte Bildung der erwähnten Radikalindikatoren von der Dosis der verabreichten Methanderivate abhängig?

c) Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere und einer Induktion der gen. Radikalindikatoren?

Fragestellung a). Eine statistische Prüfung der ersten Fragestellung besteht in einem Vergleich der spontanen mit der spezifischen Bildung der o. e. Radikalindikatoren nach einer Verabreichung der bromierten Methanderivate. Hierzu sind die Dosiswirkungsflächen wie von Schmid und Beuter (1982) herangezogen worden. Das Prinzip der Auswertung geht aus der folgenden Abbildung hervor.

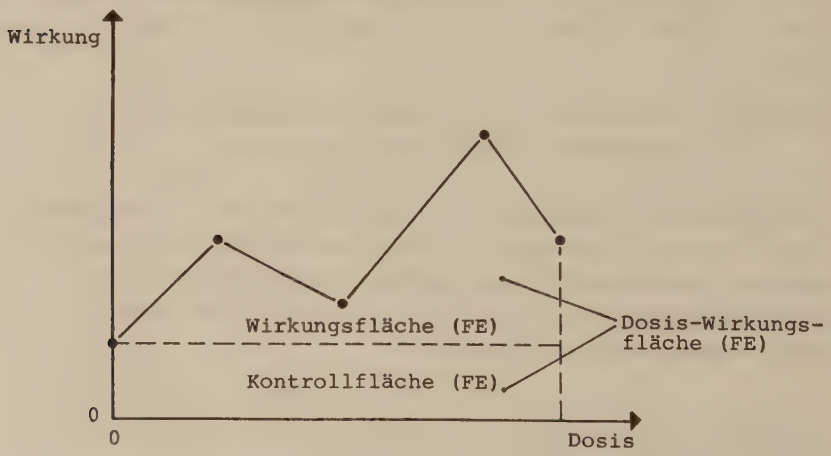


Abb. 38: Dosis-Wirkungs-, Wirkungs- und Kontrollfläche (FE: Flächeneinheit)

Die vorstehende Abbildung zeigt die Dosis-Wirkungsfläche, welche sich aus der substanzspezifischen Wirkungsfläche und der unspezifischen Kontrollfläche zusammensetzt.

Aus der Abbildung ergibt sich, daß die Maßeinheit dieser Flächen (FE) die Dimension Dosis mal Wirkung hat. Außerdem ergibt sich, daß eine substanzspezifische Wirkung dann vorliegt, wenn die Dosis-Wirkungsfläche signifikant größer o d e r kleiner als die zugehörige Kontrollfläche ist, was grundsätzlich im gesamten oder einem Teilbereich der untersuchten Dosen der Fall sein kann (Schmid 1983).

Der statistische Vergleich der Dosis-Wirkungs- und Kontrollflächen ist mit dem LORD-Test (Sachs 1978) für Stichprobenumfänge ≤ 20 vorgenommen worden. Das Prüfungsergebnis geht aus Tabelle 16 hervor.

Tab. 16: Dosis-Wirkungs- und Kontrollflächen der Kohlenwasserstoffexspiration und MDA-Bildung in der Leber ($\bar{x}$)

Brommethanderivat	Parameter	DWF (FE)	KF (FE)	p
CH_3Br	Ethan	1460	677	$<0,01$
	Pentan	130	32	$<0,05$
	MDA	2802	2170	$>0,05$
CH_2Br_2	Ethan	16540	8809 (a)	$<0,01$
	Pentan	3663	338	$<0,01$
	MDA	19223	16345	$>0,05$
$CHBr_3$	Ethan	24097	3631	$<0,01$
	Pentan	8377	210	$<0,01$
	MDA	19238	12965	$<0,01$
CBr_4	Ethan	2562	940	$<0,01$
	Pentan	142	38	$<0,05$
	MDA	3274	2099	$<0,01$

(a): Summe aus Kontrollfläche gem. Tab. 10 und Dosis-Wirkungsfläche gem. Tab. 8 (s. Abbildung 19); DWF: Dosis-Wirkungsfläche; FE: Flächeneinheit (nmol·mg/kg²·180 min); KF: Kontrollfläche

Aus Tabelle 16 ergibt sich, daß die intraperitoneale Verabreichung der untersuchten vier Brom-Methanderivate eine signifikante Zunahme der Ethan- und Pentanexspiration zur Folge hat, und daß auch die Malondialdehydbildung in der Leber der Versuchstiere, mit Ausnahme von Mono- und Dibrommethan, signifikant ansteigt.

Fragestellung b). Die mögliche Dosisabhängigkeit der Ethan- und Pentanexspiration sowie der Malondialdehydbildung in der Leber der Versuchstiere ist anhand des Vorzeichentestes nach DIXON und MOOD (Sachs 1978) geprüft worden. Das Ergebnis geht aus Tabelle 17 hervor.

Tab. 17: Positive Dosis-Wirkungskorrelation der Kohlenwasserstoffexspiration und Malondialdehydbildung

Brommethan-derivat	Parameter	p
CH_3Br	Ethan	<0,005
	Pentan	<0,005
	MDA	<0,005
CH_2Br_2	Ethan	<0,01
	Pentan	<0,01
	MDA	<0,025
$CHBr_3$	Ethan	<0,01
	Pentan	<0,005
	MDA	>0,05
CBr_4	Ethan	<0,005
	Pentan	<0,005
	MDA	>0,05

Der vorstehenden Tabelle läßt sich entnehmen, daß eine Steigerung der Dosis bei allen vier untersuchten Brommethanderivaten mit signifikanter Häufigkeit eine Zunahme der Ethan- und Pentanexspiration zur Folge hat, wogegen dies bei der Malondialdehydbildung nur für Monobrommethan zutrifft.

Abgesehen von einer positiven Abhängigkeit der Ethanexspiration von der Dosis, ist bei allen vier Brommethanderivaten auch eine statistisch gesicherte positive Abhängigkeit von der Expositionszeit der Versuchstiere im Exsikkator beobachtet worden, die jedoch nur für Monobrommethan in Tabelle 6 und Abbildung 14 angegeben worden ist.

Fragestellung c). Die Abhängigkeit der Ethanexspiration sowie der Malondialdehydbildung in der Leber vom Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere (Tab. 7, 11, 13, 15; Abb. 15, 16, 22, 23, 29, 30, 36 und 37) ist mittels des erwähnten LORD-Testes (Sachs 1978) geprüft worden. Dabei sind die Ergebnisse mit den von der normalen Sauerstoffspannung (20 Vol%) abweichenden Partialdrücken mit den Resultaten bei einem Sauerstoffanteil von 20 Vol% verglichen und in Tabelle 18 zusammengefaßt worden.

Tab. 18: Änderung der Ethanexspiration (nmol/kg·t) und der Malondialdehydbildung in der Leber (nmol/g·t) mit dem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere (a)

Brommethanderivat	Parameter	Sauerstoffpartialdruck (Vol%)				
		15,0	17,5	22,5	25,0	100,0
CH_3Br	Ethan	+9,2*	+4,2	+0,2	+2,3	-0,2
	MDA	+3,6	+0,5	+0,1	-0,3	+0,8
CH_2Br_2	Ethan	-3,3*	-3,4*	-0,4	-3,1*	-6,1**
	MDA	+3,3	+1,5	+3,1	+1,9	-6,1*
$CHBr_3$	Ethan	-1,7	+0,9	+0,9	-0,2	-11,7*
	MDA	-1,7	+1,8	+0,4	+0,1	+1,7
CBr_4	Ethan	+14,8*	+0,6	-0,7	+2,7	+2,1
	MDA	-3,6	-0,3	-2,8	-5,0	-2,2

(a): Bezug 20 Vol%; +: Zunahme; -: Abnahme; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Aus Tabelle 18 läßt sich entnehmen, daß

a) eine A b n a h m e des Sauerstoffpartialdruckes
   - die Ethanexspiration nach Mono- und Tetrabrommethan
     s t e i g e r t und nach Dibrommethan s e n k t,
     während

b) eine Z u n a h m e des Sauerstoffpartialdruckes
   - die Ethanexspiration nach Di- und Tribrommethan s e n k t
   - und die MDA-Bildung nach Dibrommethan s e n k t.

IV DISKUSSION

Im folgenden werden die durchgeführten Untersuchungen und ihre Ergebnisse im Hinblick auf die Frage erörtert, ob Mono-, Di-, Tri- und Tetrabrommethan in vivo zu Radikalen biotransformiert werden.

1 Methodik

Zum Nachweis einer endogenen Radikalbildung aus den erwähnten vier Brom-Methanderivaten sind Ethan und Pentan in der Exspirationsluft und Malondialdehyd in der Leber der Versuchstiere bestimmt worden.

Die Bildung von Ethan bei einer radikalbedingten Lipidperoxidation in vivo ist vielfach beschrieben (Cohen et al., 1968; Dillard et al., 1976; Dumelin und Tappel, 1977; Dumelin et al., 1977; Frank et al., 1980; Köster et al., 1977; Riely et al., 1974; Schmid und Beuter, 1982; Schmid und Christoph, 1980; Tappel und Dillard, 1981). Gleiches gilt für die Entstehung von Pentan (Dillard et al., 1976; Dumelin und Tappel, 1977; Dumelin et al., 1977; Frank et al., 1980; Tappel und Dillard, 1981).

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß in dem zur Gewinnung der Exspirationsluft gebrauchten Exsikkator bereits Ethanspuren nachweisbar sind, wenn er Dibrommethan ohne Versuchstiere enthält (Tabelle 8, Abbildung 17). Zur Erklärung dieses Befundes bieten sich zwei Möglichkeiten an:

a) Eine Verunreinigung von Dibrommethan mit Ethan oder
b) eine Entstehung von Ethan in vitro durch Reaktion des Methanderivates mit Alkali - hier: Atemkalk.

Welche dieser Möglichkeiten zutrifft, kann nicht zweifelsfrei entschieden werden. Die offenbare Unabhängigkeit der Ethanmenge von der im Exsikkator vorliegenden Dibrommethandosis (Tabelle 8, Abbildung 19), ist eher mit der zweiten Alternative vereinbar.

Die Dosisunabhängigkeit der Ethanmenge (Abbildung 19) eröffnet die Möglichkeit ihrer einfachen rechnerischen Berücksichtigung bei der Versuchauswertung (Tabelle 16).

Im Gegensatz zu Ethan und Pentan, hat sich das zunächst miterfaßte Ethen (Tabelle 5) als unspezifischer Parameter zum Nachweis von Radikalen erwiesen, da es bei den in vitro-Versuchen mit Di-, Tri- und Tetrabrommethan (Abbildung 17, 24 und 31) in erheblicher Menge nachzuweisen und dabei offenbar mit der vorgelegten Dosis des Brom-Methanderivates korreliert ist (Tab. 8).

Erheblich länger als Ethan und Pentan ist Malondialdehyd als Radikalindikator beschrieben (Bernheim et al., 1945; Abramson, 1949; Dahle et al., 1962; Dillard und Tappel, 1971 und 1973; Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976; Asakawa und Matsushita, 1979; Terao und Matsushita, 1981).

Sowohl für Ethan und Pentan als auch Malondialdehyd gilt das "Prinzip des positiven Beweises": Sie zeigen Radikale an, w e n n sie nachgewiesen werden; ihre Abwesenheit schließt jedoch Radikale nicht aus. Dafür gibt es vor allem folgende Gründe:

a) Die Kohlenwasserstoffe können nach ihrer Entstehung bzw. Reinspiration metabolisiert werden (Schmid und Beuter, 1981).
b) Malondialdehyd ist eine sehr reaktionsfähige Verbindung, die nach ihrer Bildung in vivo schnell weiterreagiert (Mead, 1976; Plaa und Witschi, 1976).
c) Sofern eine Radikalbildung enzymatisch erfolgt, können die metabolisierenden Enzyme - häufig mischfunktionelle Monooxygenasen - durch die entstandenen Radikale geschädigt und damit inaktiviert werden, so daß die Radikalbildung rasch zum Erliegen kommt (Recknagel et al., 1977).

2 Ergebnisse

Kontrollversuche. Bei den Kontrollversuchen mit unvorbehandelten (Tabelle 4, Abbildung 8) und mit paraffinum liquidum belasteten Versuchstieren (Tabelle 9), hat sich

gezeigt, daß auch unter diesen Umständen eine gewisse Exspiration von Ethan und Pentan sowie eine Malondialdehydbildung in der Leber nachweisbar ist, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (Dillard et al., 1976; Ramstoeck et al., 1980; Schmid und Christoph, 1980; Schmid und Jungbauer, 1980; Beuter, 1981; Friedrich, 1981; Gienger, 1982; Kreuzer, 1982). Der Grund ist eine spontane, permanent ablaufende Lipidperoxidation (Schmid, 1982).

Ein Vergleich der Tabellen 4 und 9 zeigt, daß die Spontanbildung von Ethan, Pentan und Malondialdehyd durch die Verabreichung des als Lösungsmittel für Di-, Tri- und Tetrabrommethan verwendeten Paraffinöls nicht beeinflußt wird.

Testversuche. Die wichtigsten Ergebnisse der Testversuche sind in Tabelle 16 zusammengefaßt. Sie zeigt - mit Ausnahme der Malondialdehydbildung durch Mono- und Dibrommethan - eine statistisch gesicherte Mehrbildung aller Radikalindikatoren durch die bromierten Methanderivate, welche nur mit einer endogenen Radikalbildung erklärt werden kann.

Diese Interpretation gilt auch für Mono- und Dibrommethan, weil die Malondialdehydbildung

- durch Monobrommethan eine eindeutige Dosisabhängigkeit aufweist (Tabelle 5, Abbildung 13) und
- im Falle des Dibrommethans zweifelsfrei nachweisbar ist (Tabelle 10, Abbildung 21), auch wenn sie mit steigender Dosis (infolge radikalischer Enzymschädigung) offenbar mehr oder weniger zum Erliegen kommt (s. oben).

Die Annahme einer endogenen Umwandlung der untersuchten Brom-Methanderivate zu Radikalen wird gestützt durch die aus Tabelle 17 hervorgehende positive Dosis-Wirkungskorrelation, welche nur für Malondialdehyd nach Tri- und Tetrabrommethan statistisch nicht objektiviert werden konnte. Der Grund scheint auch hier eine mit steigender Dosis zunehmende Schädigung der an der Radikalbildung beteiligten Enzyme zu sein, weil die Malondialdehydbildung im Bereich niedriger Dosen zunächst stark ansteigt und nach höheren Dosen wieder abfällt (Abbildung 28 und 35).

Dieses, schon im Zusammenhang mit einer Erörterung der Methodik erwähnte Phänomen, ist auch von anderen Untersuchern (Schmid und Beuter, 1981; Gienger, 1982; Kreuzer, 1982) beobachtet worden. Die radikalische Enzymschädigung führt bei dosisabhängiger Wiederholung in den Verteilungsräumen eines radikalbildenden Wirkstoffes im Organismus zu einem mehrgipfeligen unorthodoxen Dosis-Wirkungs-Zusammenhang (Schmid, 1983), wie er z. B. in den Abbildungen 28 und 35 dargestellt ist.

Weniger eindeutig als die endogene Umwandlung der untersuchten Brom-Methanderivate zu Radikalen, ist die aus Tabelle 18 hervorgehende Abhängigkeit der Kohlenwasserstoffexspiration und Malondialdehydbildung vom Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere. Immerhin lassen sich die statistisch gesicherten Effekte - mit Ausnahme der Ethanexspiration nach Dibrommethan - dahingehend zusammenfassen, daß eine E r n i e d r i g u n g (15 Vol%) des normalen Sauerstoffpartialdruckes (20 Vol%) die Radikalbildung s t e i g e r t , während eine E r h ö h u n g der Sauerstoffspannung (100 Vol%) die Radikalbildung h e m m t. Dies ist eine bekannte (Kieczka et al., 1979) Beobachtung, die sich am einfachsten mit einer r e d u k t i v e n Biotransformation der Brom-Methanderivate zu Radikalen erklären läßt, wie dies von Reynolds und Moslen (1980) für Halothan beschrieben wurde. Man wird sich jedoch vor einer Verallgemeinerung hüten müssen, weil beim einen oder anderen Wirkstoff ebensogut eine o x i d a t i v e metabolische Radikalbildung vorstellbar ist.

Im Zusammenhang mit dieser Interpretation bleibt hinzuzufügen, daß die erwähnte Korrelation der Radikalbildung mit dem Sauerstoffpartialdruck ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Enzymen an der Entstehung der Radikale ist.

Vergleichende Schlußfolgerungen. Bei einem Vergleich der metabolischen Radikalbildung von c h l o r i e r t e n und b r o m i e r t e n Methanderivaten zeigt sich, daß die Bromderivate offenbar stärkere Radikalbildner sind. Dies ergibt sich aus Untersuchungen von Schmid und Jungbauer (1979), die zwar bei Tetra- und möglicherweise auch Trichlormethan (Tetrachlorkohlenstoff bzw. Chloroform), nicht jedoch bei Di- und Monochlormethan eine Radikalbildung in vivo (Mäuse) nachweisen konnten. Ein Grund der unterschiedlichen Neigung der Brom- und Chlorderivate zur metabolischen Radikalbildung dürfte die geringere Bindungsstabilität der Bromatome am Kohlenstoff sein. Die Bindungsstabilität ist nach Butler (1961) der Partialladung der Halogenatome (d. h. u. a. ihrer Elektronegativität) proportional, die wie folgt angegeben wird (Dailey, 1960; Reynolds, 1972):

Tab. 19: Partialladungen an den Halogenatomen verschiedener Methanderivate (10^{-10} esu)

Halogen	Mono-	Di-	Tri-	Tetra-Substituent
Chlor	-0,99	-0,70	-0,52	-0,39
Brom	-0,87	-0,59	-0,42	-0,31

esu: Elektrostatische Einheit

Die aus Tabelle 19 gleichfalls ersichtliche Abhängigkeit der Partialladung vom Substitutionsgrad macht darüber hinaus verständlich, daß die höher halogenierten Derivate des g l e i c h e n Substituenten (Chlor und Brom) im allgemeinen stärker zur Radikalbildung neigen als die geringer substituierten Verbindungen (Reynolds, 1972; Musgrave, 1974; Reynolds und Moslen, 1980).

Ein entsprechender Wirkungsvergleich der untersuchten Brom-Methanderivate auf äquimolarer Basis ist wegen ihrer unterschiedlichen Verträglichkeit für Versuchstiere, d. h.

ihrer zwangsläufig unterschiedlichen Dosierung bei den durchgeführten Versuchen, nicht ohne weiteres möglich. Hilfsweise sind deshalb die Dosen mit maximaler Ethanexspiration in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Tab. 20: Brom-Methan-Dosen mit maximaler Ethanbildung

Brom-Methan-derivat	Dosis (mmol/kg)	Ethanexspiration (nmol/kg·180 min)
CH_3Br	2,16	43
CH_2Br_2	5,18	15
$CHBr_3$	4,08	34
CBr_4	0,65	26

Die Gegenüberstellung vermittelt den Eindruck, daß die Wirksamkeit bei den untersuchten bromierten Methanderivaten in der Reihenfolge CBr_4 - CH_3Br - $CHBr_3$ - CH_2Br_2 abnimmt, d. h. mit Ausnahme des Monobrommethans, der Bindungsstabilität der Bromatome am Kohlenstoff umgekehrt proportional ist. Weshalb Monobrommethan diese Regel durchbricht, kann nur vermutet werden. Die naheliegendste Erklärung ist sein g a s -förmiger Aggregatzustand und damit sein größeres Verteilungsvolumen im Organismus. Die Folge ist eine relativ geringere Wirkstoffkonzentration im Verteilungsvolumen und damit eine geringere "Radikaldichte", d. h. eine relativ geringere Inaktivierung der an der Radikalbildung beteiligten Enzymsysteme.

Das abweichende Verhalten des Monobrommethans zeigt, daß die Neigung der verschiedenen bromierten Methanderivate zur metabolischen Radikalbildung - trotz gewisser allgemeiner Gesetzmäßigkeiten - nicht a priori vorhergesagt werden kann. Dies rechtfertigt im übrigen auch die durchgeführten Tierversuche.

In toxikologischer Hinsicht erklärt die nachgewiesene metabolische Radikalbildung die allen Brom-Methanderivaten eigene Leber- und Parenchymtoxizität (s. Literaturteil). Eine weitere Konsequenz ist die Möglichkeit, daß alle vier Verbindungen mutagene und/oder cancerogene Eigenschaften haben, deren Abwesenheit bei jedem Derivat und für jede Tierart ggf. gesondert bewiesen werden muß.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden experimentelle Untersuchungen zur Klärung der Frage beschrieben, ob Monobrommethan (Methylbromid), Dibrommethan (Methylenbromid), Tribrommethan (Bromoform) und Tetrabrommethan (Tetrabromkohlenstoff) in vivo zu Radikalen biotransformiert werden.

Die Versuchstiere waren erwachsene, konventionell gehaltene und ernährte männliche Mäuse.

Als Radikalindikatoren sind Ethan und Pentan in der Exspirationsluft gaschromatographisch und Malondialdehyd in der Leber der Versuchstiere spektrophotometrisch bestimmt worden.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Alle bromierten Methanderivate steigern nach intraperitonealer Applikation die Ethan- und Pentanexspiration sowie die Malondialdehydbildung in der Leber der Versuchstiere.
2. Die vermehrte Bildung der gen. Radikalindikatoren ist mit wenigen Ausnahmen positiv mit der Dosis der bromierten Methanderivate korreliert.
3. Die Kohlenwasserstoffexspiration (Ethan, Pentan) und die Malondialdehydbildung in der Leber sind dem Sauerstoffpartialdruck im Atemgas der Versuchstiere in der Regel umgekehrt proportional.
4. Aus den Untersuchungsbefunden wird der Schluß gezogen, daß Mono-, Di-, Tri- und Tetrabrommethan bei Mäusen einer überwiegend reduktiven metabolischen Radikalbildung unterliegen.
5. Hieraus ergibt sich, daß diese Brom-Methanverbindungen potentiell mutagene und/oder cancerogene Eigenschaften haben, deren Abwesenheit bei jedem Derivat und für jede Tierart ggf. gesondert bewiesen werden muß.

RADICAL FORMATION IN VIVO BY BROMINATED METHANE DERIVATIVES

SUMMARY

The present study reports on experimental investigations that were carried out to clarify whether monobromomethane (methyl bromide), dibromomethane (methylene bromide), tribromomethane (bromoform) and tetrabromomethane (carbon tetrabromide) are biotransformed to radicals in vivo.

Test animals were adult male mice, which were kept and nourished conventionally.

Ethane and pentane in exhaled air were measured gaschromatographically and malonic dialdehyde in the livers of test animals was measured spectrophotometrically to serve as indicators of radical formation.

The results may be summarized as follows:

1. All brominated methane derivatives enhance ethane and pentane expiration as well as malonic dialdehyde formation in the livers of test animals following intraperitoneal application.
2. The enhancement of the mentioned radical indicators showed a positive correlation with the dose of the respective brominated methane derivative in all but a few cases.
3. The expiration of hydrocarbons (ethane, pentane) and the formation of malonic dialdehyde in the liver are generally inversely proportional to the partial pressure of oxygen in the inhaled air of the test animals.
4. From these results the conclusion is drawn that mono-, di-, tri- and tetrabromomethane are subject mainly to reductive metabolic radical formation in mice.
5. It follows that these brominated methane derivatives potentially have mutagenic and/or cancerogenic properties, the absence of which has to be proved separately for every derivative and every species.

VI LITERATURVERZEICHNIS (siehe auch Nachtrag)

Abramson H
The oxidation of unsaturated fatty acids in normal and scorbutic guinea pigs.
Journ. Biol. Chem. 178, 179-183, 1949

Ahmed AE, Anders MW
Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic bromide. I: In vitro studies
Drug Metabol. Dispos. 4, 357-361, 1976

Ahmed AE, Anders MW
Metabolism of dihalomethanes to formaldehyde and inorganic bromide. II: Studies on the mechanism of the reaction
Biochem. Pharmacol. 27, 2021-2025, 1978

Ahmed AE, Kubic VL, Anders MW
Metabolism of haloforms to carbon monoxide. I: In vitro studies
Drug Metabol. Dispos. 5, 198-204, 1977

Ahmed AE, Kubic VL, Anders MW
Halogenated methanes: metabolism and toxicity
Fed. Proc. 39, 3150-3155, 1980

Anders MW, Kubic VL, Ahmed AE
Metabolism of halogenated methanes and macromolecular binding
Journ. Environm. Pathol. Toxicol. 1.2, 117-124, 1977

Anders MW, Stevens JL, Spraque RW, Shaath Z, Ahmed AE
Metabolism of haloforms to carbon monoxide. II: In vivo studies
Drug Metabol. Dispos. 6, 556-560, 1978

Asakawa T, Matsushita S
Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides
Lipids 14, 401-406, 1979

Asakawa T, Matsushita S
A colorimetric microdetermination of peroxide values utilizing aluminium chloride as the catalyst
Lipids 15, 965-967, 1980

Bätjer K, Faust J, Gabel B, Koschorrek M, Lahl U, Lierse K, Schirmer M, Stachel B, Thiemann W,
Untersuchung über die Verteilung von leichtflüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffen im Bremer Trinkwasser
Schriftenreihe der Universität Bremen, 1979

Bailey PS, Keller JE
Ozonation of amines. III: t-Butylamine
Journ. Org. Chem. 33, 2680-2684, 1968

Barber AA, Bernheim F
Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues
Adv. Gerontol. Res. 2, 355-403, 1967

Bernheim F, Bernheim MLC, Wilbur KM
The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids
Journ. Biol. Chem. 174, 257-264, 1945

Beuter W
Untersuchungen von Mn(II)-,Ni(II)-,Sn(II)-und Pb(II)- Ionen auf radikalbildende Eigenschaften in vivo
München: Med. vet. Diss. 1981

Beuter W
Persönliche Mitteilung, 1982

Beutler E
Drug induced hemolytic anemia
Pharmacol. Rev. 21, 73, 1969

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Richtlinien über Vorsichtsmaßnahmen bei der Anwendung von Methylbromid zur Schädlingsbekämpfung in Räumen, Begasungsanlagen oder unter gasdichten Planen
Berlin-Dahlem, 1961

Borbely F
Vergiftungen durch halogenierte Kohlenwasserstoffe In:
Bader EW, Hersg.
Handbuch der gesamten Arbeitsmedizin, Bd. II
München: Urban und Schwarzenberg Verlag 1961

Bowman FJ, Borzelleca JF, Munson AE
The toxicity of some halomethanes in mice
Tox. Appl. Pharmacol. 44, 213-215, 1978

Bunyan J, Murrell Elspeth A, Green J, Diplock AT
On the existence and significance of lipid peroxides in vitamin-E-deficient animals
Brit. Journ. Nutr. 21, 475-495, 1967

Chance B, Sies H, Boveris A
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs
Physiol. Rev. 59, 527-605, 1979

Chu I, Secours V, Villeneuve DC
The acute toxicity of four trihalomethanes in male and female rats
Tox. Appl. Pharmacol. 52, 351-353, 1980

Clarke CA, Roworth CG, Holling HE
Methyl bromide poisoning: An account of four recent cases met with in one of HM-ships
Brit. Journ. Ind. Med. 2, 17-23, 1945

Cohen G
Lipid peroxidation: Detection in vivo and in vitro through the formation of saturated hydrocarbon gases In:
Oxygen free radicals and tissue damage
Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Amsterdam, Oxford, New York: Excerpta Medica, 1979

Cohen G, Riely Caroline, Lieberman M
Ethane formation from lipid peroxides in mammalian cells
Fed. Proc. 27, 648 A. 2436, 1968

Collins RP
Methyl bromide poisoning
California Medicine 103, 112-116, 1965

Dahle LK, Hill EG, Holman RT
The thiobarbituric acid reaction and the autoxidation of polyunsaturated fatty acid methyl esters
Arch. Biochem. Biophys. 98, 253-261, 1962

Dailey BP
Halogen bond character in the alkyl halides
Journ. Chem. Physics 33, 1641-1643, 1960

Demopoulos HB
The basis of free radical pathology
Fed. Proc. 32, 1859-1861, 1973

Di Luzio NR
Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury
Fed. Proc. 32, 1875-1881, 1973

Dillard Cora J, Tappel AL
Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes
Lipids 6, 715-721, 1971

Dillard Cora J, Tappel AL
Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl-ethanolamine and phenylalanine
Lipids 8, 183-189, 1973

Dillard Cora J, Dumelin EE, Tappel AL
Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat
Lipids 12, 109-114, 1976

Dixon M, Needham DM
Biochemical research on chemical warfare agents
Nature 158, 432-438, 1946

Dugan PR
Rapid spectrophotometric determination of microgram amounts of lauroyl and benzoyl peroxide
Analytical Chemistry 33, 696-698, 1960

Dumelin EE, Tappel AL
Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of PUFA and decomposition of preformed hydroperoxides
Lipids 12, 894-899, 1977

Dumelin EE, Dillard Cora J, Purdy RE, Tappel AL
Sensitive measurement of lipid peroxidation products in vivo and in vitro
Fed. Proc. 36, 1160 A. 4705, 1977

Duvoir M, Fabre R, Layani F
L'intoxication par le bromure de méthyle
Bull. Soc. Pharmacol. 46, 15-26, 1939

Estefan RM, Gause EM, Rowlands JR
Electron spin resonance and optical studies of the interaction between NO_2 and unsaturated lipid components
Environm. Research 3, 62-78, 1970

Feinstein RN
Implications of organic peroxides in radiobiology
Radiation Res. Suppl. 3
New York: Academic Press, 1963

Felmeister BL, Dillard Cora J, Tappel AL
Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues
Anal. Biochem. 52, 1-9, 1970

Flohé L
Glutathione peroxidase: Fact and fiction In:
Oxygen free radicals and tissue damage
Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Amsterdam, Oxford, New York: Excerpta Medica, 1979

Flohé L, Zimmermann R
GSH-induced high-amplitude swelling of mitochondria In:
Flohé L, Benöhr HCh, Sies H, Waller HD, Wendel A, Hersg.
Glutathion
Stuttgart: Gustav Thieme Verlag, 1974

Fodor GG, Roscovano A
Erhöhter Blut-CO-Gehalt bei Mensch und Tier durch inkorporierte Halogenierte
Zentralbl. für Bakt. Parasitenk. Infektionskr. und Hygiene
Abt. 1, Orig. Band 162, 34, 1976

Foote ChS
Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems In:
Pryor WA Hersg.
Free radicals in biology. Vol. II
New York: Academic Press, 1976

Frank H, Hintze T, Remmer H
Volatile hydrocarbons in breath, an indicator for peroxidative degradation of lipids In:
Kolb B, Hersg.
Applied headspace gas chromatography
London: Heyden, 1980

Fridovich J
Superoxide dismutases
Ann. Rev. Biochem. 44, 147-159, 1975

Fridovich J
Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity
In: Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol. I, S. 239-277
New York: Academic Press, 1976

Fridovich J
Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide. In:
Oxygen free radicals and tissue damage
Ciba Foundation Symposium 65 (new sreies)
Amsterdam, Oxford, New York: Excerpta Medica, 1979

Friedrich A
Untersuchung von Chrom(III)-, Cobalt(II)-.Cer(III)- und
Quecksilber(I)- Ionen auf radikalbildende Eigenschaften in vivo
München: Med. vet. Diss., 1981

Gay HH
Blood and urinary levels following exposure to bromides
Industrial Medical Surgery 31, 438-439, 1962

Gee DL, Tappel AL
Production of volatile hydrocarbons by isolated hepatocytes:
An in vitro model for lipid peroxidation studies
Tox. Appl. Pharmacol. 60, 112-120, 1981

Gienger Susanne
Metabolische Radikalbildung von Halothan
München: Med. vet. Diss., 1982

Goodman JI, Tephly TR
A comparison of rat and human liver formaldehyde dehydrogenase
Biochim. Biophys. Acta 252, 489-505, 1971

Graham EA
Late poisoning with chloroform and other alkyl halides in
relationship to the halogen acides formed by their chemical
dissociation
Journ. Exp. Medicine 22, 48-67, 1915

Haase G, Dunkley WL
Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation I: Measure-
ment of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the
thiobarbituric acid test
Journ. Lipid Res. 10, 555-560, 1969

Haber F, Weiss J
The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts
Proc. Roy. Soc. London 147, 332-351, 1934

Halliwell B
Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase
Cell Biol. Int. Reports 2, 113-128, 1978

Haugaard N
Cellular mechanism of oxygen toxicity
Physiol. Rev. 48, 311-374, 1968

Henschler D
Vergiftungen durch Halogen-Kohlenwasserstoffe In:
Okonek S, Füllgraf G, Frey R, Hersg.
Humantoxikologie, S. 181-189
Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1979

Heppel LA, Porterfield VT
Enzymatic dehalogenation of certain brominated and chlorinated compounds
Journ. Biochem. 176, 763-770, 1948

Infestation Control
Fumigation statistics for Great Britain for the year 1966
Report of the Infestation Control Laboratory for 1965-1967, 22-23, 1969

Irish DD, Adams EM, Spencer HC, Rowe VK
Chemical changes of methylbromide in the animal body in relation to its physiological effects
Journ. Ind. Hyg. Toxicol. 23, 408-411, 1941

Isaacs NS
Reactive intermediates in organic chemistry
London: J.Wiley & Sons, 1974

Jonkman L, Luller H, Kiers C, Kommandeur J
Electron spin resonance of radicals formed in the reaction of nitrogen dioxide with olefins
Journ. Phys. Chem. 74, 1650-1652, 1970

Jordi UA
Absorption of methylbromide through the intact skin. A report of one fatal and two non-fatal cases
Journ. of Aviation Medicine 24, 536-539, 1953

Kappus H, Kieczka H, Scheulen M, Remmer H
Molecular aspects of catechol and pyrogallol inhibition of liver microsomal lipid peroxidation stimulated by ferrous ion-ADP-complexes or by carbon tetrachloride
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300, 179-187, 1977

Keen JH, Habig WH, Jakoby WB
Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferases
Journ. Biol. Chem. 251, 6183-6188, 1976

Kieczka K, Schulze R, Kappus H
Influence of different O_2-and Fe^{2+} concentrations on the CCl_4 induced lipid peroxidation
Arch. Pharmacol. 307 (S), Nr. 81, 1979

Kiese M
Methemoglobinemia: A comprehensive treatise
Cleveland: CRC Press Inc, 1974

Klingensmith JS, Mehendale HM
Potentation of brominated halomethane hepatotoxicity by chlordecone in the male rat
Tox. Appl. Pharmacol. 61, 378-384, 1981

Köster U, Albrecht D, Kappus H
Evidence for carbon tetrachloride- and ethanol-induced lipid peroxidation in vivo demonstrated by ethane production in mice and rats
Tox. Appl. Pharmacol. 41, 639-648, 1977

Köster-Albrecht D, Köster U, Kappus H, Remmer H
Inhibition of $CBrCl_3$-induced lipid peroxidation in rats in vivo by (+)-cyanidanol-3
Toxicol. Lett. 3, 363-368, 1979

Kreuzer F
Untersuchung von Enfluran auf radikalbildende Eigenschaften in vivo
München: Med. vet. Diss., 1982

Kubic VL, Anders MW, Engel RR, Barlow CH, Caughey WS
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide I: In vivo studies
Drug Metabol. Dispos. 2, 53-57, 1974

Kubic VL, Anders MW
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide II: In vitro studies
Drug Metabol. and Dispos. 3, 104-112, 1975

Kubic VL, Anders MW
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide III: Studies on the mechanism of the reaction
Biochem. Pharmacol. 27, 2349-2355, 1978

Kutob SD, Plaa GL
A procedure for estimating the hepatotoxic potential of certain industrial solvents
Tox. Appl. Pharmacol. 4, 468-474, 1962

Lewin L
Gifte und Vergiftungen
Berlin: G.Stielke Verlag, 1929

Lewis SE
Inhibition of SH-enzymes by methylbromide
Nature 161, 692-693, 1948

Lieberman M, Hochstein P
Ethylene formation in rat liver microsomes
Science 152, 213-214, 1966

Lindquist RR
Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration II: The effect of copper on rat liver lysosomes
Ann. Journ. Pathol. 53, 903-928, 1968

Lissner J, Hug D
Radiologie
Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1975

Lucas GHW
A study of the fate and toxicity of bromine and chlorine containing anesthetics
Journ. Pharm. Exptl. Ther. 34, 223-237, 1928

Malshet VG, Tappel AL, Burns VM
Fluorescent products of lipid peroxidation II: Methods for analysis and characterization
Lipids 9, 328-332, 1974

Mc Cay PB
Physiological significance of lipid peroxidation
Fed. Proc. 40, 173, 1981

Mc Cay PB, Pfeifer PM, Stipe WH
Vitamine E protection of membrane lipids during electron transport functions
Ann. N.Y. Acad. Sci. 203, 62-73, 1972

Mc Cay PB, Gibson DD, Hornbrook KR
Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble, heat-labile factor not glutathione peroxidase
Fed. Proc. 40, 199-205, 1981

Mc Cay PB, Toshikazu N, Fong K-L, Lai EK, Poyer JL
Production of radicals from enzyme systems and the use of spin traps In:
Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol. IV
New York: Academic Press, 1980

Mead JF
Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes In:
Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol I
New York: Academic Press, 1976

Merzbach L
Zur Pharmakologie des Brommethyls und einiger seiner Verwandten
Zeitschr. f.d. ges. exptl. Med. 63, 383-392, 1928

Miller DP, Haggard HW
Intracellular penetration of bromide as a feature in the toxicity of alkyl bromides
Journ. Ind. Hyg. Toxicol. 25, 423-433, 1943

Munson AE, Sanders VM, Borzelleca JF, Tardiff RG, Barrett BA
Reticuloendothelial system function in mice exposed to four haloalkanes: Drinking water contaminants
Tox. Appl. Pharmacol. 45, 329-330, 1978

Musgrave WKR
Halogene
Enzyklopaedia Britannica Macropaedia 13, 682-687, 1974

Nash T, Prattle RG
The absorption of phosgene by aqueous solutions and its relation to toxicity
Ann. Occup. Hyg. 14, 227-233, 1971

Von Oettingen WF
The halogenated hydrocarbons. Toxicity and potential dangers
Public Health Service publication No. 414
Washington: U.S.Government Printing Office, 1955

Von Oettingen WF
The halogenated hydrocarbons of industrial and toxicological importance
New York: Elsevier, 1964

Oh SH, Gantner HE, Hoekstra WG
Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes
Biochem. 13, 1825-1829, 1974

Peters JW, Foote CS
Chemistry of superoxide ion. II: Reaction with hydroperoxides
Journ. Am. Chem. Soci. 98, 873-875, 1976

Phillips GO
Energetics and mechanisms in radiation biology
New York: Academic Press, 1968

Philpot JS
The estimation and identification of organic peroxides
Radiat. Res. Suppl. 3, 55-70, 1963

Plaa GL, Witschi H-P
Chemicals,drugs, and lipid peroxidation
Ann. Rev. Pharmacol. 16, 125-141, 1976

Pohl LR, Booshan B, Krishna G
Mechanisms of the metabolic activation of chloroform
Tox. Appl. Pharmacol. 45, 238, 1978

Pryor WA
Free radical reactions and their importance in biochemical systems
Fed. Proc. 32, 1862-1869, 1973

Pryor WA
The role of free radical reactions in biological systems In:
Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol. I
New York: Academic Press, 1976

Ramstoeck ER, Hoeckstra WG, Ganther HE
Trialkyllead metabolism and lipid peroxidation in vivo in vitamin E- and selenium-deficient rats as measured by ethane production.
Tox. Appl. Pharmacol. 54, 251-257, 1980

Rathus EM, Landy PJ
Methylbromide poisoning
Brit. Journ. Ind. Med. 18, 53-57, 1961

Recknagel RO
Carbon tetrachloride hepatotoxicity
Pharmacol. Rev. 19, 145-208, 1967

Recknagel RO
Carbon tetrachloride hepatotoxicity: status quo and future prospects
Trends in pharmacol. sci. 4, 129-131, 1983

Recknagel RO, Goshal AK
Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity
Laborat. Invest. 15, 132-148, 1966

Recknagel RO, Glende EA Jr., Hruszkewycz AM
Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity In:
Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol. III
New York: Academic Press, 1977

Remmer H
Schutzmechanismen des tierischen Organismus gegen Radikale und deren Folgeprodukte
Der praktische Tierarzt 63, 778-790, 1982a

Remmer H
Die problematische Wirkung von Leberschutzstoffen
Dtsch. Ärztebl. 79, 42-46, 1982b

Reynolds ES
Comparison of early injury to liver endoplasmatic reticulum by halomethanes, benzene, toluene, bromobenzene, methionine, thioacetamide and dimethylnitrosamine
Biochem. Pharmacol. 21, 2555-2561, 1972

Reynolds ES, Yee AG
Liver parenchymal cell injury. V: Relationship between patterns of chloromethane- ^{14}C incorporation into constituents of liver in vivo and cellular injury
Laborat. Invest. 16, 591-603, 1967

Reynolds ES, Moslen MT
Free radical damage in liver In:
Pryor WA, Hersg.
Free radicals in biology. Vol. IV
New York: Academic Press, 1980

Riely Caroline A, Cohen G, Liebermann M
Ethane evolution. A new index of lipid peroxidation
Science 183, 208-210, 1974

Roehm JN, Hadley JC, Menzel DB
Oxidation of unsaturated fatty acids by ozone and nitrogen dioxide
Arch. Environm. Health 23, 142-148, 1971

Römpp H
Chemie Lexikon, 7. Auflage
Stuttgart: Franck'sche Verlagsbuchhandlg., 1974

Rodkey FL, Collison HA
Effect of dihalogenated methanes on the in vivo production of carbon monoxide and methane by rats
Tox. Appl. Pharmacol. 40, 39-47, 1977

Roubal WT
Free radicals, malonaldehyde and protein damage in lipid--protein systems
Lipids 6, 62-64, 1971

Sachs L
Angewandte Statistik, 5. Auflage
Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1978

Sagai M, Tappel AL
Lipid peroxidation induced by some halomethanes as measured by in vivo pentane production in the rat
Tox. Appl. Pharmacol. 49, 283-291, 1979

Saprin AN, Piette LH
Spin trapping and its application in the study of lipid peroxidation and free radical production with liver microsomes
Arch. Biochem. Biophys. 180, 480-492, 1977

Schenkman JB, Gibson GG
Status of the cytochrome P-450 cycle
Trends. Pharmacol. Sci. 2, 150-152, 1981

Schmid A
Radikalbildung organischer Schadstoffe
Der praktische Tierarzt 63, 801-807, 1982

Schmid A
Persönliche Mitteilung, 1983

Schmid A, Christoph M
Untersuchungen zur Genese der parenteralen Eisenvergiftung
Der praktische Tierarzt 61, 589-595, 1980

Schmid A, Jungbauer Claudia
Fremdstoffexspiration von Mäusen nach parenteraler Belastung mit chlorierten Methanderivaten
Arch. Pharmacol. 76, 311, 1980

Schmid A, Beuter W
unveröffentlichte Ergebnisse, 1981

Sell DA, Reynolds ES
Liver parenchymal cell injury. 8: Lesions of membranous cellular components following iodoform
Journ. Cell. Biology 41, 736-752, 1969

Sies H, Wendel A
Functions of glutathione in liver and kidney
Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1978

Slater TP
Free radical mechanisms in tissue injury
London: Pion, 1972

Slater TP
Mechanisms of protection against the damage produced in biological systems by oxygen derived radicals In:
Oxygen free radicals and tissue damage
Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Amsterdam, Oxford, New York: Excerpta Medica, 1979

Smith GJ, Dunkley WL
Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal ion
Arch. Biochem. Biophys. 98, 46-48, 1962

Stevens JL, Anders MW
Studies on the mechanism of metabolism of haloforms to carbon monoxide
Tox. Appl. Pharmacol. 45, 297-298, 1978

Stevens JL, Anders MW
Metabolism of haloforms to carbon monoxide III: Studies on the mechanism of the reaction
Biochem. Pharmacol. 28, 3189-3194, 1979

Stevens JL, Ratnayake JH, Anders MW
Metabolism of dihalomethanes to carbon monoxide IV: Studies in isolated rat hepatocytes
Tox. Appl. Pharmacol. 55, 484-489, 1980

Steward RD, Fisher TN, Hosco MJ, Petersen JE, Baretta ED, Dodd HC
Carboxyhemoglobin elevation after exposure to dichloromethane
Science 176, 295-296, 1972a

Steward RD, Fisher TN, Hosco MJ, Petersen JE, Baretta ED, Dodd HC
Experimental human exposure to methylene chloride
Arch. Environm. Health 25, 342-348, 1972b

Sweeny GD
Functional heterogeneity among liver cells. Implications for drug toxicity and metabolism
Trends Pharmacol. Sci. 2, 141-144, 1981

Sykes P
Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie, 7. Auflage
Weinheim: Verlag Chemie, 1976

Tappel AL
Free radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vit. E and selenium
Fed. Proc. 24, 73-78, 1965

Tappel AL
Vitamine E and free radical peroxidation of lipids
Ann. N.Y. Acad. Sci. 203, 12-28, 1972

Tappel AL
Lipid peroxidation damage to cell components
Fed. Proc. 32, 1870-1874, 1973

Tappel AL, Dillard Cora J
In vivo lipid peroxidation: Measurement via exhaled pentane and protection by vitamine E
Fed. Proc. 40, 174-178, 1981

Terao J, Matsushita S
Thiobarbituric acid reaction of methyl arachidonate monohydroperoxide isomers
Lipids 16, 98-101, 1981

Thomas HV
Lipoperoxidation of lung lipids in rats exposed to nitrogen dioxide
Science 159, 532-534, 1968

Trombly R, Tappel AL, Gonigli JG, Grognan WM Jr., Rhamy RK
Fluorescent products and polyunsaturated fatty acids of human testes
Lipids 10, 591-596, 1975

Urano S, Matsuo M
A radical scavenging reaction of α-tocopherol with methyl radical
Lipids 11, 380-383, 1976

Viner N
Methyl bromide poisoning: A new industrial hazard
Canad. Med. Ass. Journ. 53, 43-45, 1945

Volger Christiane
Verfahren der Bodenentseuchung und ihre Bedeutung für die Aufzucht von Forstpflanzen
Schriftent. d. Forstw. Fak. d. Univ. Göttingen 26, 3-80, 1962

Wills ED
Effects of irradiation on subcellular components I: Lipid peroxide formation in the endoplasmatic reticulum
Int. Journ. Radiat. Res. 17, 217-228, 1970

Wills ED, Wilkinson AE
Effects of irradiation on subcellular components II: Hydroxylation in the microsomal fraction
Int. Journ. Radiat. Res. 17, 229-236, 1970

Willson RL
Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: What relevance in vivo In:
Oxygen free radicals and tissue damage
Ciba Foundation Symposium 65 (new series)
Amsterdam, Oxford, New York: Excerpta Medica, 1979

Wohlgemuth R
Methoden zur Konzentrationsmessung von Methylbromid im Vorratsschutz
Berlin-Dahlem: Mitteilungen aus der Biolog. Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 1971

Wohlgemut R
Persönliche Mitteilung, 1982

Yamamoto J
Mode of action of synergists in enhancing the insecticidal activity of pyrethrum and pyrethroids In:
Casida JE, Hersg.
Pyrethrum. The natural insecticide
New York, London: Academic Press, 1973

Zimmermann R
Radikalbildung im tierischen Organismus und deren pathogenetische Bedeutung
Der praktische Tierarzt 63, 770-778, 1982

Nachtrag

Beyer H
Lehrbuch der organischen Chemie, 19. Auflage
Stuttgart: S. Hirzel Verlag, 1981

Butler TC
Reduction of carbon tetrachloride in vivo and reduction of carbon tetrachloride and chloroform in vitro by tissue constituents
Journ. Pharmacol. 134, 311-319, 1961

Fletcher BL, Dillard Cora J, Tappel AL
Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues
Anal. Biochem. 52, 1-9, 1973

Schmid A, Beuter W
Metabolische Radikalbildung aus Tetrachloräthylen und ihre Beeinflussung durch Enzyminduktion bzw. -hemmung
Zbl. Vet. Med. A 29, 481-488, 1982

Wurster Claudia
Struktur-Wirkungsbeziehungen von chlorierten Methanderivaten
München: Med. vet. Diss., 1980

Mein sehr herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Schmid für die Überlassung des Themas, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und seine stets freundlich gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Außerdem danke ich Frau B. Ferlings, Frau M. Kußmaul und Herrn Dr. W. Beuter für ihre oftmals wertvolle Hilfe.

LEBENSLAUF

Geburtstag	21. 12. 1953
Geburtsort	Baldingen, Kreis Donau-Ries
Eltern	Frieda Kähn, geb. Kießling Karl Kähn, Landwirt
Schulbildung	nach Besuch der Volksschule; 1964 Übertritt in das Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen Abitur 1974
Wehrdienst	Juli 1974 bis September 1974 in Kempten im Allgäu; Oktober 1974 bis September 1975 in Dillingen/Donau
Studium	ab Wintersemester 1975/76 Studium der Veterinärmedizin am Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen	Mai 1981
Approbation	Juni 1981
Familienstand	seit 1981 verheiratet mit Romy Kähn, geb. Rotter